Lane

IMPLANTATIE-METASTASEN

CHEMOTHERAPEUTISCHE PROPHYLAXE EN GROEI IN GEÏNFECTEERD MILIEU

A. ZWAVELING

LANE LIBRARY. STANFORD UNIVERSITY.

STELLINGEN

1. Behandeling en nacontrole van de kankerpatiënt vereisen teamwork.

2. Kankerchemotherapeutica kunnen het optreden van locaal recidief tengevolge van implantatiemetastasering tegengaan.

3. De kans op uitgroei van kankercellen is groter in een steriel, dan in een met E. coli geïnfecteerd milieu.

4. De indeling van bronchus-adenomen in het cylindromateuze en het carcinoide type berust niet alleen op morphologische, doch ook op histochemische en histogenetische verschillen.

5. Het gebruik van oraal werkzame progestativa tijdens de graviditeit dient vooralsnog beperkt te blijven tot allyloestrenol.

6. Aangezien een aantal patiënten met zuivere mitralisstenose, waarbij de indicatie tot commissurotomie bestaat, slechts op een bevredigende wijze te behandelen zijn met de open-hart techniek, moet naar criteria worden gezocht waardoor deze groep prae-operatief kan worden geselecteerd.

7. De prognose van patiënten met myocard-infarct verbetert indien zij continue worden behandeld met anticoagulantia.

8. Men dient er rekening mede te houden, dat kankerchemotherapeutica bij toediening tijdens de reproductieve periode een mutagene werking kunnen hebben.

9. Bij een lymfeklierzwelling van onbekende oorsprong dient een verwijderde lymfeklier niet alleen histologisch, doch ook cytologisch en bacteriologisch onderzocht te worden.

10. Het „vitalisme" bij de dichter H. Marsman is een vorm van doodsangst.

IMPLANTATIE-METASTASEN

CHEMOTHERAPEUTISCHE PROPHYLAXE EN GROEI IN GEÏNFECTEERD MILIEU

De experimenten werden verricht in het Chirurgisch Laboratorium van de Heelkundige Kliniek der Rijksuniversiteit te Leiden.
Het pathologisch-anatomisch onderzoek vond plaats met medewerking van Prof. Dr A. Schaberg en de collegae H. T. Planteydt en Dr R. G. J. Willighagen.
De statistische analyse geschiedde in het Instituut voor Theoretische Biologie der Rijksuniversiteit te Leiden onder leiding van Prof. Dr H. R. v. d. Vaart.

IMPLANTATIE-METASTASEN

CHEMOTHERAPEUTISCHE PROPHYLAXE EN GROEI IN GEÏNFECTEERD MILIEU

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR IN DE GENEESKUNDE AAN DE RIJKSUNIVERSITEIT TE LEIDEN, OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS Mr J. V. RIJPPERDA WIERDSMA, HOOGLERAAR IN DE FACULTEIT DER RECHTSGELEERDHEID, TEGEN DE BEDENKINGEN VAN DE FACULTEIT DER GENEESKUNDE TE VERDEDIGEN OP WOENSDAG 23 NOVEMBER 1960 TE 16 UUR

DOOR

ALBERT ZWAVELING

geboren te Oud-Schoonebeek in 1927

PROMOTOR:

PROF. DR M. VINK

AAN MIJN OUDERS
AAN MIJN VROUW

"The cancer-surgeon must be pathologist, amateur physicist, physiologist and statistician, as well as surgeon and philosopher."

EUGENE BRICKER

INHOUD

Inleiding 1

Litteratuuroverzicht

Hoofdstuk I. Enige facetten van het metastaseringsvraagstuk . 3

Hoofdstuk II. Implantatiemetastasering in de kliniek 11

Hoofdstuk III. Prophylaxe van implantatiemetastasering . . . 17

Hoofdstuk IV. Enige kankerchemotherapeutica 21

Hoofdstuk V. Kankerchemotherapie in het dierexperiment . . 29

Hoofdstuk VI. Kankerchemotherapie in de chirurgische kliniek . 33

Experimenteel gedeelte

I. Intraperitoneale implantatiemetastasering bij de muis en de prophylactische waarde hierbij van resp. formaldehyde 0,1%, TSPA en Melphalan

Proefopstelling 41
Proeven en proefresultaten 45
Discussie 68

II. Groei van subcutaan geïnoculeerde tumorcellen bij de muis in een steriel- resp. in een met E. coli geïnfecteerd milieu

Proefopstelling 71
Proeven en proefresultaten 76
Discussie 86

Samenvatting en conclusies 89

Summary and conclusions 95

Geraadpleegde litteratuur 101

INLEIDING

Het laat zich aanzien, dat de huidige resultaten van de kankerchirurgie moeilijk te verbeteren zijn door nog uitgebreider resecties te verrichten. Zelfs is er een tendenz merkbaar om van de zeer grote resecties terug te komen en men vraagt zich af of deze inderdaad wel het overlevingspercentage verbeteren, nog afgezien van de grote belasting voor de patiënt die deze grote en vaak mutilerende ingrepen met zich meebrengen.

Het is misschien mogelijk langs andere wegen de resultaten te verbeteren. Eén ervan is, de kans op locaal recidief zo klein mogelijk te maken, o.a. door implantatiemetastasering in het wondbed te voorkomen.

In dit proefschrift wordt het probleem van het locale recidief en de implantatiemetastasering bestudeerd, waarbij vooral aandacht is besteed aan het vraagstuk der prophylaxe en de rol die kankerchemotherapeutica daarbij kunnen spelen.

In het dierexperiment is onderzocht of implantatiemetastasering op het peritoneum kan worden tegengegaan met kankerchemotherapeutica, waarbij de keus is gevallen op formaldehyde 0,1% en op de stoffen triaethyleen-thio-phosphoramide en phenyl-alanine-mosterd.

Tevens is er experimenteel nagegaan, of het al dan niet besmet zijn van een milieu met E. coli invloed heeft op de groei van de in dat milieu ingebrachte kankercellen. Dit onderzoek werd verricht met het oog op kankeroperaties van de tractus digestivus, waarbij, in tegenstelling tot vroeger, de darm veelal prae-operatief wordt gesteriliseerd. Zou de uitgroei van kankercellen in een met E. coli besmet milieu geremd worden, dan zou bij deze operaties nu nog meer dan voorheen voorkomen moeten worden, dat levende tumorcellen in het operatieterrein achterblijven.

Hoofdstuk I

ENIGE FACETTEN VAN HET METASTASERINGSVRAAGSTUK

Voor de chirurg zijn de volgende eigenschappen van een kwaadaardig gezwel van het grootste belang:

1. infiltratieve groei, die bij microscopisch onderzoek soms zeer uitgebreid kan blijken te zijn (Vos [184], Kuyjer [103], Coller et al. [34], Meissner [127], Quer et al. [145]).
2. neiging tot uitzaaiing elders in het lichaam.
3. neiging tot recidief, indien niet alle maligne gezwelweefsel verwijderd is. Dit is de reden, dat het noodzakelijk is bij kankeroperaties, voorzover die een curatief doel nastreven, de sneevlakken durante operationem te doen controleren op tumorweefsel.

De slechte prognose van het kwaadaardig gezwel wordt voor een groot deel bepaald door de neiging tot metastasering. Deze kan in drie phasen worden onderscheiden (v. Rijssel [156]):

a. het geraken van cellen of groepjes cellen in de stroombaan van bloed of lymphe, of in een lichaamsholte.
b. verplaatsing en blijven steken van de tumorcellen c.q. vasthechting op een met mesotheel beklede oppervlakte.
c. uitgroei tot een dochtertumor.

ad. a

De cellen geraken in de bloed- of lymphebaan of in een lichaamsholte ten gevolge van doorgroei in deze structuren. Een kwaadaardige tumor infiltreert gemakkelijk een venewand en groeit door in het lumen (Dukes [48], Grinnell [75]). Hetzelfde geldt voor lymphevaten. Arteriewanden bieden door hun barrière van tunica elastica en glad spierweefsel echter meer weerstand (Ackerman en del Regato [1]), zodat hier zelden doorgroei wordt waargenomen. Afhankelijk van de graad van cohesie kunnen, nadat doorgroei heeft plaats gevonden, cellen of groepjes cellen losraken en versleept worden.

Vele onderzoekers nemen aan, dat de cohesie van kankercellen geringer is dan van normale cellen, waardoor deze gemakkelijker zouden loslaten (Mac Cutcheon et al. [121], Coman [35, 36], Gatch [67]).

GATCH oppert zelfs de veronderstelling, dat hoe geringer de cohesie is, hoe kwaadaardiger het gezwel zou zijn. Bij de z.g. letale kankers zou de cohesie zo gering zijn, dat uitzaaiing reeds plaats gevonden heeft vóór de diagnose gesteld is. Patiënten met een 5-jaarsoverleving zouden allen kankers hebben gehad met een grote cohesie. In zijn algemeenheid is deze stelling echter strijdig met waarnemingen, die er op wijzen, dat het vinden van gezwelcellen in de bloedbaan niet per se een prognostisch ongunstig kenmerk is.

ad. b

I. *haematogene versleping*

WALTHER [185] heeft in een klassiek werk aan de hand van zeer uitgebreid sectie-materiaal aangetoond, dat de metastasering via de bloedbaan hoofdzakelijk bepaald wordt door mechanische wetten: de tumorcellen worden weggevangen door een eerstvolgend capillairnet. WIEBERDINK [192] heeft dit werk van WALTHER getoetst en uitgebreid, en kwam tot vrijwel dezelfde conclusies. Zijn onderscheiding in een viertal metastaseringstypen geeft de clinicus een grote steun bij het onderzoek op haematogene metastasen. Deze metastaseringstypen zijn achtereenvolgens:

1e: Vena pulmonalis type. Dit type ontstaat, als uitzaaiing plaats vindt via de takken der v.v. pulmonales. Het eerste capillairfilter wordt gevormd door de capillairen der grote circulatie. Tumorcelembolieën met mogelijk verdere uitgroei zijn te verwachten in o.a. hersenen, botten en lever.

2e: Vena cava type. Hier vindt verspreiding der kankercellen plaats via takken der v.cava. Het eerste capillairfilter is de long, zodat primair longmetastasen te verwachten zijn. Van hieruit kan dan wederom uitzaaiing plaats hebben volgens het vena pulmonalis type.

3e: Vena portae type. Er is doorgroei en vervolgens uitzaaiing via de takken van de vena portae. Het eerste filter bestaat uit levercapillairen, het tweede filter is weer in de long, terwijl het derde filter gevormd wordt door de capillairen der grote circulatie.

4e: Mengtypen. Deze komen voor, overal waar „vasa privata" en „vasa publica" aanwezig zijn, met een gemeenschappelijk capillairnet. Hierdoor behoort de lever tot het 1e filter bij tumoren die metastaseren volgens het v. pulmonalis type (via de a. hepatica), tot het 2e filter bij metastasering volgens het v. cava type (eveneens via de a. hepatica). Voor tumoren, metastaserend volgens het v. portae type is de lever uitsluitend een 1e filter.

Deze metastaseringstheorie geeft wel aan, waar uitzaaiingen te verwachten zijn, maar dit komt lang niet altijd overeen met de klinische waarnemingen. Herhaaldelijk blijkt, dat het eerste filter vrij is van metastasen, een tweede filter deze echter wel bevat. Het is mogelijk, dat tumorcellen

het eerste capillairnet passeren (MOORE [132], ENGELL [49]) zonder weggevangen te worden. Eventueel kan via een open septum c.q. persisterende ductus Botalli dit verschijnsel worden verklaard; of metastasering via de plexus vertebralis plaats vindt, is een nog niet uitgemaakte zaak. Al deze verklaringen gaan echter o.i. voorbij aan het feit, dat deze theorie der metastaseringstypen alleen aangeeft waar de tumorcellen worden weggevangen, maar door haar mechanische karakter geen rekening kan houden met factoren die de uitgroei van deze tumorcelembolieën tot echte metastasen bepalen. Op deze factoren zal bij de paragraaf waarin de uitgroei tot dochtertumoren wordt behandeld, nog worden teruggekomen.

II. *lymphogene versleping*

Verspreiding van kankercellen langs de lymphebanen kan tot stand komen hetzij via permeatie, hetzij via echte uitzaaiing, analoog aan de haematogene metastasering.

De lymphevaten vormen een gesloten systeem, waarin bij goed functionerende kleppen de lymphe stroomt in een afferente richting t.o.v. lymphekliéren en bloed. De lymphebanen passeren in hun loop minstens één klier, alvorens de lymphe uitgestort wordt in de bloedbaan. Deze lymphekliéren zijn meestal in ketens gerangschikt, zodat de lymphe uit een bepaald gebied eerst een z.g. regionale lymphekliér passeert, vervolgens via een klier van de 2e orde stroomt, etc. De aanvoerende lymphebaan eindigt in het perifere kliergebied, waar de meegevoerde tumorcellen zullen worden weggevangen. Verdere tumorcelversleping vanuit de aldus aangedane klier treedt eerst op nadat de klier vrijwel geheel volgegroeid is met tumor. De lymphekliér is dus inderdaad een effectieve (tijdelijke) barrière tegen verdere versleping (ZEIDMAN en BUSS [199], GILCHRIST en DAVID [70]).

Vanuit de primaire tumor kan echter reeds vroegtijdig uitzaaiing via collaterale lymphebanen naar verder gelegen klierstations hebben plaatsgevonden.

Het blijft verder mogelijk, dat via lymphogene metastasering alsnog een haematogene uitzaaiing optreedt, hetzij doordat de tumorcellen bevattende lymphestroom tenslotte in de bloedbaan wordt uitgestort, hetzij doordat er ter plaatse van een aangetaste lymphekliér vene-ingroei plaats vindt. Retrograde metastasering, dat is versleping tegen de normale lymphestroom in, is zeer zeldzaam (ZEIDMAN [200], WIEBERDINK [192], WALTHER [185]).

Wil de chirurg enige zekerheid hebben een radicale resectie te hebben verricht, dan is het noodzakelijk, dat het verst gelegen klierstation dat gereseceerd wordt, vrij van tumorweefsel is. Afgaan op het gevoel bij de beoordeling van klieren bij kankeroperaties is onjuist; vergrote klieren, ook al voelen ze vast aan, bevatten herhaaldelijk geen tumor, maar

vertonen alleen hyperplasie; niet vergrote klieren daarentegen kunnen metastasen herbergen.

De prognose wordt aanzienlijk slechter indien lymphekliermetastasen aanwezig zijn (GRINNELL [75, 76], KUYJER [105], GILCHRIST en DAVID [70]). Dit geldt eveneens voor het aanwezig zijn van vene-ingroei (SUERMONDT [175], GRINNELL [75], DUKES [48], SUNDERLAND [177]), hoewel zeker niet bij elke intravasculaire infiltratie ook al haematogene metastasering zal zijn opgetreden (BROWN en WARREN [21]).

III. *metastasering in lichaamsholten*

WALTHER [185] onderscheidt naar SAMPSON drie stadia:

fixatie van de cel door een fibrineklompje
organisatie van dit fibrineklompje, met vaatingroei
littekenvorming c.q. verdere uitgroei tot een metastase.

Voordat een dergelijke uitzaaiing plaats heeft, moet de tumor eerst in deze holten zijn doorgegroeid. De dan losgelaten cellen worden verder getransporteerd door de bewegingen der ingewanden of door de zwaartekracht. Dit laatste verklaart het veelvuldig voorkomen van metastasen in het cavum recto-vesicale of het cavum Douglasi. Eveneens moet volgens dit mechanisme de Krukenberg-tumor worden verklaard.

Door lymphogene uitbreiding na ingroei in een lymphevat kan verspreiding naar andere lichaamsholten plaats vinden, zodat een polyserositis carcinomatosa ontstaat. Een subsereuze metastasering, waarbij primair haematogeen of lymphogeen de tumorcellen onder de serosa zijn aangevoerd, moet van de echte implantatiemetastasering worden onderscheiden; de nesteling vindt hier plaats onder het mesotheel en eerst na doorgroei is er geen onderscheid meer mogelijk.

Of er ook implantatie op met intact epitheel beklede oppervlakten kan voorkomen, is nog niet met zekerheid aangetoond; mogelijk dat dit bij de vrouwelijke genitalia, waar een analogon met de eicel aanwezig is, in sommige gevallen kan voorkomen. Het is mogelijk dat in die gevallen waar men meende implantatie op slijmvliezen waar te nemen, er een continuiteitsverbreking van het epitheel heeft bestaan, waardoor de cel zich kon nestelen en van een voldoende bloedvoorziening kon verzekeren.

ad. c

De tumorcelembolieën behoeven niet noodzakelijkerwijs tot metastasen uit te groeien. SCHABERG [161] vermeldt enige experimenten, die het waarschijnlijk maken dat bij de metastasering onderlinge celaffiniteiten een rol kunnen spelen. KLEIN (geciteerd door v. RIJSSEL [156]) maakte aannemelijk dat bij het al- of niet aanslaan van een tumorcel de potentie om onder andere omstandigheden (i.c. als metastase in andere weefsels) te kunnen groeien van belang is; omgekeerd beïnvloedt de toestand van de „voe-

dingsbodem" eveneens het al of niet uitgroeien tot een dochtertumor (FISHER en FISHER [62]). DEELMAN [45] vond in de milt hoopjes tumorcellen zonder tekenen van enige activiteit; de voedingsbodem was hier kennelijk niet optimaal. FISHER en FISHER [60, 62] hebben in een reeks experimenten de factoren nagegaan die de levermetastasering beïnvloeden, indien intraportaal levende tumorcellen werden ingebracht bij ratten. Zij konden door herhaalde laparotomieën gepaard gaande met levermanipulaties, in een veel groter aantal gevallen levermetastasen opwekken dan zonder deze stimulering het geval was. Klaarblijkelijk bevonden zich in de levers van de dieren een groot aantal slapende tumorcellen, die door deze traumatische stimulans gewekt werden.

Dit zal men in gedachten moeten houden als men overweegt een „second look" te verrichten; de mogelijkheid om latente tumormetastasen tot activiteit te brengen is aanwezig. Hetzelfde geldt voor partiële hepatectomieën wegens primair of metastatisch carcinoom.

Men moet er dus rekening mee houden, dat ook al zijn er geen aantoonbare metastasen, er toch tumorcellen op de loer kunnen blijven liggen die, door een ons nog onbekende oorzaak, plotseling gaan groeien (KARRER [93]). Hiernaast zal het lichaam ongetwijfeld ook met een aantal kankercellen definitief kunnen afrekenen. Dit blijkt wel uit de onderzoekingen die zijn verricht omtrent het voorkomen van tumorcellen in de bloedbaan.

In 1934 werd de eerste systematische poging hiertoe ondernomen door POOL en DUNLOP [144] en vanaf 1955 komen de publicaties omtrent dit onderwerp regelmatig voor (FISHER en TURNBULL [59], ENGELL [49, 50], STUART-ROBERTS et al. [173, 174], SANDBERG en MOORE [157], SANDBERG et al. [158], MOORE et al. [128, 129]). De gezwelcellen worden meer gevonden bij ver-voortgeschreden kankers met een lage differentiatiegraad, maar komen ook geregeld voor in het bloed van patiënten met curabele tumoren. Het materiaal van ENGELL bestond uit 123 geopereerde patiënten, waarvan na 5—9 jaar nog 55 in leven waren. Bij 51% van deze overlevenden werden tijdens de operatie tumorcellen in het bloed waargenomen, terwijl dit percentage op het totaal 61 bedroeg. De tumorcellen bij de patiënten die 5 jaar of langer overleefden, moeten òf te gronde zijn gegaan, òf latent gebleven zijn; in elk geval hebben deze tot nu toe de patiënt niet geschaad.

Men moet zich echter afvragen of in alle gevallen waar „tumorcellen" werden gezien, dit ook inderdaad tumorcellen waren, want het is gebleken, dat in het bloed van patiënten met kanker behalve gezwelcellen ook atypische cellen kunnen voorkomen, die vaak moeilijk van echte tumorcellen zijn te differentiëren. Deze atypische cellen zijn ten dele onrijpe elementen van het haemopoëtische systeem, ten dele weefselcellen, maar ook is van een aantal aard en herkomst onbekend (SANDBERG et al. [159], SPRIGGS [169]).

Afgezien van het feit, dat een deel van de in de bloedbaan geraakte tumorcellen niet levensvatbaar zullen zijn, mag men aannemen, dat het lichaam een aantal levende tumorcellen onschadelijk kan maken. Het is zelfs mogelijk, dat reeds zich klinisch openbarende gezwelvorming tot verdwijnen komt zonder dat enige therapie wordt toegepast (EVERSON en COLE [54]). Ook uit de experimenten van GRACE en KONDO [73], die bij kankerpatiënten autotransplantaten van tumoren implanteerden, blijkt de grote weerstand van de mens tegen zijn eigen tumorcellen. Onderdrukken van deze afweerreacties door b.v. cortison, geeft in het dierexperiment een sterk versnelde tumorgroei te zien (MOORE en KONDO [131]). MAC DONALD [124] verwerpt het dogma, dat de uitbreiding van een tumor, inclusief zijn metastasering, recht evenredig is met de tijd die verlopen is sinds het ontstaan van het proces. Hiervoor in de plaats stelt hij de theorie, dat het biologisch gedrag van het gezwel, mét de weerstand van de patiënt, de prognose bepaalt. Deze theorie wordt getoetst aan grote statistieken. Ook wordt het volgende lijstje gegeven:

grootte primaire tumor	aantal patiënten	% stad. IP*
< 1 cm	18	44
1—3 cm	95	37
3—5 cm	53	36
> 5 cm	33	23

Alleen tussen zeer kleine en zeer grote tumoren is er dus verschil in het optreden van metastasen.

Beziet men gevallen, die zeer vroeg of zeer laat onder behandeling kwamen, dan krijgt men als resultaat:

duur	aantal patiënten	% stad. IP
< 1 maand	53	41
1— 6 maanden	72	33
6—12 maanden	37	38
> 12 maanden	38	23

Wat de metastasering betreft, speelt het tijdstip van onder behandeling komen eerst na zeer lange tijd een duidelijke rol. Een kleine tumor kan reeds gemetastaseerd zijn, een grote nog niet; een vroeg gediagnostiseerde tumor kan reeds uitgezaaid zijn, terwijl een laat gediagnostiseerd gezwel nog volledig curabel kan zijn. De prognose van een kwaadaardige tumor is geen product van zijn duur en zijn afmeting. De natuurlijke selectie bepaalt ons resultaat en niet de vroege behandeling. Bij elke kankeroperatie hebben wij te maken met een zeer bepaalde biologische eenheid,

* Stad. IP: tumorgroei beperkt tot de mamma, zonder tekenen van metastasering.

die vanaf de inductieve phase vaststaat: zo kan een klinisch vroeg gediagnostiseerde kanker reeds biologisch (te) laat zijn en omgekeerd. Ook CRILE [43] en PAULSON [141] zijn deze mening toegedaan, terwijl KUYJER [104, 105] bij zijn onderzoek betreffende de prognose van het maagcarcinoom vóór, resp. na de oorlog, een vrijwel constant overlevingspercentage vindt bij degenen bij wie een als curatief beschouwde resectie was verricht. Uiteraard stijgt het absolute aantal 5-jaars overlevingen aanzienlijk door toename der operabiliteit en betere technieken die minder post-operatieve sterfte geven, maar per chirurgisch curabel geval wordt geen betere kans geboden dan vroeger. Uit het onderzoek van BROWN en KANE [22] is gebleken dat operabiliteit, resectabiliteit en 5-jaars overlevingen van het maagca. *niet* afhankelijk zijn van de duur dat de patiënten klachten hadden. Ook de gemiddelde grootte der tumoren deed er weinig toe; of iemand te gronde gaat aan zijn maagcarcinoom hangt af van zijn eigen weerstand en van de aard van zijn carcinoom, niet in de eerste plaats van vroege diagnostiek en zeer uitgebreide resectie.

WASSINK [187] beschrijft in zijn artikel over de vooruitgang in de behandeling van kwaadaardige gezwellen, hoe voorzichtig men moet zijn met de interpretatie van de feiten en cijfers over dit onderwerp. Hij gebruikt het begrip „kwaadaardigheidsgraad", dat beschouwd wordt als de resultante van de wisselwerking tussen gezwel en drager, kortom „le grain et le terrain". Ook al zou voor elk individueel geval de kwaadaardigheid een constante zijn, de weerstand van de patiënt is dat zeker niet, maar zal kunnen wisselen en is beïnvloedbaar.

Het hele probleem van deze z.g. „host-resistance" is nog onopgelost, hoewel op dit terrein veel onderzoek verricht wordt. Het valt echter buiten het bestek van dit proefschrift hierop dieper in te gaan.

Naast de grootheid kwaadaardigheidsgraad, zal toch zeker de vroege diagnostiek een belangrijke rol spelen volgens WASSINK. Dit betoog is rationeel, immers alleen het feit, dat kanker door groei per continuitatem incurabel kan worden, pleit hiervoor.

Bovendien zal nog blijken, dat proeven op dieren aangetoond hebben, dat het effect van een kankerchemotherapeuticum omgekeerd evenredig is met het aantal aanwezige kankercellen. Tenslotte zijn er tumoren, die pas laat metastaseren. Dit zijn dus weliswaar geen zeer virulente tumoren, maar ook als deze gemetastaseerd zijn, is de prognose veel slechter. Toch hebben de onderzoekers die wij hebben gerefereerd, ons gewaarschuwd tegen al te grote verwachtingen van vroege diagnostiek.

De aan de oppervlakte van een kwaadaardig gezwel gelegen cellen laten gemakkelijk los. PAPANICOLAOU [140] was de eerste, die deze cellen voor de diagnostiek gebruikte (aanvankelijk voor aandoeningen van de vrouwelijke genitalia) door het celmateriaal uit te strijken op een objectglas, te fixeren en te kleuren volgens een speciale methode. Tijdelijk raakte deze methode

in onbruik, maar sedert 1939 wordt zij steeds meer toegepast, ook voor de diagnostiek van andere aandoeningen, vooral van kwaadaardige gezwellen. De laatste jaren zijn zeer veel publicaties hierover verschenen, waarvan een groot deel de cytologie van de tractus digestivus tot onderwerp heeft (Hunter en Richardson [90], Wisseman et al. [193], Bryant et al. [24], Pollard et al. [142], Knape [98, 99], Bruinsma [23], Raskin et al. [147, 148], Blonk [15], Gephart en Graham [68], van Esser [52], Galambos en Klayman [65], Bader en Papanicolaou [6], Bowden en Papanicolaou [19], Loeb en Scapier [116], Garret et al. [66], Vink [183], Richardson [150], Goei [71], Fremont-Smith et al. [64]).

Uit deze publicaties blijkt, dat in veel gevallen waar maligniteit bestaat, tumorcellen aanwezig zijn in het lumen van maag of darm. In het algemeen zullen deze geëxfolieerde kankercellen weinig levenskrachtig zijn, maar implantatie en uitgroei zal voor kunnen komen op plaatsen waar de continuïteit van het slijmvlies is verbroken. In het bijzonder kan dit het geval zijn durante operationem, waarbij tengevolge van de manipulatie met het gezwel meer levensvatbare cellen of zelfs gehele tumorbrokjes in het lumen kunnen geraken en een reëel implantatiegevaar optreedt, zoals in de volgende hoofdstukken uiteengezet zal worden. De cytologie komt o.i. een plaats toe in de kliniek voor de diagnostiek van kwaadaardige aandoeningen: het verkrijgen van materiaal is eenvoudig en het onderzoek is gemakkelijk te herhalen, wat voor de controle van belang is. Bovendien kan het onderzoek reeds positief uitvallen bij een carcinoom in situ, als andere methoden nog falen. Als nadeel geldt de meestal niet absoluut betrouwbare diagnose, aangezien de cytoloog veelal moet afgaan op losse cellen of een enkel celklompje en het histologisch samenhangende beeld mist. Evenmin is meestal de graad van maligniteit en het aantal mitosen goed vast te stellen. Ons dunkt dan ook, dat niet alleen op het oordeel van de cytoloog moet worden afgegaan, maar dat de waarde van de methode ligt in het feit, dat ze samen met andere methoden van onderzoek (Röntgendiagnostiek, rectoscopie, biopsie, gastroscopie etc.) ons een meer volledig beeld kan geven van de aandoening waaraan de patiënt lijdende is. Juist deze combinatie van onderzoekmethoden leidt tot een betere diagnostiek. Indien alleen het cytologisch onderzoek tot een uitspraak komt en deze is dubieus, dan is herhaling van het onderzoek en zorgvuldige controle gewenst. Geeft de cytoloog daarentegen als classificatie „maligniteit waarschijnlijk", terwijl de andere methoden van onderzoek geen aanknopingspunten voor maligniteit opleveren, dan zal de clinicus zich ernstig moeten beraden op een therapeutisch ingrijpen en in ieder geval het onderzoek op korte termijn dienen te herhalen. Komt de cytoloog dan weer tot eenzelfde conclusie, dan zal de clinicus o.i. de patiënt „the benefit of the doubt" niet mogen onthouden.

Hoofdstuk II

IMPLANTATIEMETASTASERING IN DE KLINIEK

Er zijn vele aanwijzingen, dat sommige geëxfolieerde tumorcellen de potentie hebben om zich elders te implanteren en het uitgangspunt te vormen van een dochtertumor. In nog sterkere mate geldt dit voor cellen, die bij een poging tot verwijdering van een maligne gezwel in het wondbed achterblijven — de Angelsaksische litteratuur spreekt hier van „tumorspilling" — aangezien deze meestal veel levenskrachtiger zijn dan afgestoten cellen van het oppervlak van een tumor. Bij nesteling in wondbed of naad kan een recidief ontstaan. In principe zal het resultaat niet verschillen van een locaal recidief ten gevolge van onvoldoende verwijdering van de primaire tumor. Niet altijd zijn deze twee mogelijkheden dan ook scherp van elkaar te onderscheiden.

Het gevaar van contaminatie van een operatiewond met kankercellen zag Lambert Lack [107] reeds in 1896 duidelijk in; hij beschrijft in dat jaar een operatie wegens een sarcoom aan de onderkaak, waarbij in aansluiting hierop een tracheostomie werd verricht. Negen maanden later trad een recidief op in het tracheostomie-litteken. Verder noemt hij twee gevallen, waarbij wegens peritonitis carcinomatosa paracentese van de buik werd verricht en waarbij secundaire groei optrad t.h.v. de steekplaatsen, terwijl het er onder liggende peritoneum vrij was van tumor. Ook vermeldt hij reeds een geval van implantatie door hechtmateriaal: hier was via een laparotomie een kwaadaardige ovariumtumor verwijderd, die tijdens de operatie was gebarsten. Zeven maanden later werd wegens ascites een relaparotomie verricht, waarbij, gerangschikt in twee rijen, tumortjes aan weerszijden van het litteken werden gevonden. De schrijver raadt aan een kwaadaardige tumor in zijn geheel ruim uit te snijden en bij morsen van tumorcellen het wondvlak te spoelen met cauteristica zoals onverdund carbolzuur.

Lawrie [112] (1906) zag eveneens entmetastasering. Ruim een jaar na een operatie wegens een sigmoidcarcinoom ontstond een knikkergrote tumor in het litteken van de operatiewond, zonder verbinding met de originele, niet verwijderde tumor. Tijdens deze operatie was een klier bij het lospellen gebarsten. Waarschijnlijk terecht, ziet hij deze als de besmettingsbron.

Ook Butlin [26] waarschuwt reeds in 1907 voor het snijden in kankers. Instrumenten voor een biopsie gebruikt, moeten eerst worden uitgekookt, alvorens ze voor de eigenlijke operatie mogen worden gebruikt.

Voor entmetastasen stelde hij de volgende criteria op:

a. het secundaire gezwel moet van eenzelfde histologische bouw zijn als het primaire gezwel.
b. de primaire tumor moet, ten tijde dat de beweerde implantatie is ontstaan, in het operatieterrein hebben blootgelegen.
c. er moet contact mogelijk zijn geweest tussen de plaats van het primaire gezwel en die van de secundaire tumor.

Wij zouden hieraan nog toe willen voegen, dat er histologisch géén verbinding mag worden aangetoond tussen het primaire en secundaire gezwel, òf dat op histologische grond moet zijn aangetoond, dat het primaire gezwel geheel is verwijderd tijdens de ingreep waarbij mogelijk de enting is opgetreden. Ook een metastatisch proces moet worden uitgesloten, evenals een nieuwe, ter plaatse ontstane tumor. Voor de duidelijkheid zij hierbij nog opgemerkt, dat met primair gezwel de entingsbron wordt bedoeld en dat het uitgangspunt in dit geval ook een metastase kan zijn.

Ryall [153, 154] (1907) ziet ook als verklaring van kankerrecidief in het operatieterrein een besmetting hiervan met tumorcellen. Hij geeft fraaie voorbeelden van implantatie in hechtingen, in littekens en in het steekgat van een paracentese. Van niet alle 24 aangehaalde gevallen wordt echter aangetoond, dat ze aan de criteria van Butlin voldoen, vele zijn echter zeer illustratief. Hij merkt op, dat tumoren met een vrij langzame groei zich na een niet-radicale ingreep vaak zeer virulent gaan gedragen. Hiermede is hij een der eersten geweest van hen, die de weerstand van de patiënt in hun overwegingen betrokken. Opvallend zijn Ryall's zeer moderne inzichten in de kankerchirurgie. Zelfs heden is men er nog niet altijd van doordrongen, dat een proefbiopsie moet worden uitgevoerd alsof een virulent absces geopend wordt (in de prae-antibiotische tijd!) met instrumenten- en handschoenenwisseling en opnieuw ontsmetten en afdekken van het operatieterrein. En wordt nu bij barsten van een tumor of een kliermetastase wel steeds de wond gecauteriseerd met een celdodend middel, zoals Ryall het reeds voorschreef? Men is er vaak nog veel te weinig van doordrongen met wat voor „infectieus" materiaal men te maken heeft bij kankeroperaties, zonder hiertegen een goed afweermiddel te bezitten. Ryall is een der eersten geweest die zich volledig bewust was van het kwaad, dat de chirurg kan aanrichten als hij zonder kennis van de gevaren en zonder voorzorgen, een kwaadaardig gezwel attaqueert.

Mayo [119] heeft eveneens grote aandacht besteed aan het gevaar van de entmetastasering. Behalve metastasen in het gebied waar de hechtingen waren gelegd, nam hij een entmetastase waar in een colostomie, aangelegd wegens een rectumcarcinoom. Twaalf dagen na de colostomie vond een resectie van het recto-sigmoid plaats, 6 inches boven de tumor. Enige tijd later ontwikkelde zich de entmetastase zonder verdere tekenen van metastasering. Ook waarschuwt hij voor het gevaar van haematogene of lympho-

gene metastasering ten gevolge van te krachtige manipulatie met de tumor vóór of tijdens de operatie. Na proefbiopsie volge zo mogelijk direct aansluitend de operatie; kan operatie niet direct volgen, dan moet de biopsieplaats worden gecauteriseerd. Bij een biopsie van een gelocaliseerde tumor moet men de gehele tumor ruim verwijderen, zonder deze in te snijden; voorts make men bij elke kankeroperatie zoveel mogelijk gebruik van het diathermische mes. Als de drie voorwaarden voor een goede kankeroperatie noemt hij:

a. ruime excisie
b. verwijdering van het bijbehorend lymphedrainagegebied
c. voorkómen van implantaties.

Met deze drie punten zijn alle principes zoals wij die kennen, reeds helder geformuleerd.

In 1936 onderzocht Saphir [160] messen, die door een maligne tumor gesneden hadden, op tumorcellen en *kon in 100% der gevallen deze cellen aantonen.*

White [191] beschrijft een duidelijk geval van entmetastasering na een radicale mastectomie wegens mammacarcinoom, waarbij zonder handschoenenwisseling een dun huidtransplantaat elders gesneden werd, ter bedekking van het defect. Drie maanden later werd groei van een adenocarcinoom op de donorplaats vastgesteld.

Goligher en medewerkers [72] konden op hun materiaal van carcinomen van rectum en rectosigmoid 15 gevallen van onverwacht locaal recidief waarnemen, dat is bij 7% van hun geopereerde patiënten. Sinds de schrijvers maatregelen nemen om losse tumorcellen te doden (waarover later) hebben zij slechts twee recidieven gezien, hoewel de meeste operaties waarop het onderzoek betrekking had, werden verricht na het invoeren van genoemde maatregelen. Een van deze twee recidieven ontstond in een geval, waarbij de darm scheurde vóórdat maatregelen tegen de tumorcellen genomen waren en het andere geval moet, volgens de schrijvers, hoogstwaarschijnlijk niet aan implantatie toegeschreven worden.

Vink [183] verrichtte een onderzoek naar het voorkomen van tumorcellen in de aan- en de afvoerende lis bij open resecties wegens carcinoom van colon en rectum, waarbij na de resectie de continuïteit werd hersteld. Het tumorbevattende darmdeel werd bij deze operaties zo snel mogelijk geïsoleerd en na de verwijdering werd het preparaat eveneens gespoeld en het spoelsel op tumorcellen onderzocht. Tevens werd nagegaan, of voor de mobilisatie van het tumorbevattende darmgedeelte intensieve of minder intensieve manipulatie nodig was.

Op 50 onderzochte spoelsels van de aanvoerende lis werd geen enkele maal een positief of verdacht spoelsel verkregen, daarentegen waren van de 32 spoelsels van een afvoerende lis er 5 positief en 8 verdacht. Het spoelsel van het resectiepreparaat was van de 46 onderzochte preparaten

slechts 4 maal *negatief*. Er bleek voorts een duidelijk positieve relatie te bestaan tussen de intensiteit van de manipulatie en de aanwezigheid van tumorcellen in de afvoerende lis: tengevolge van de manipulatie waren er kennelijk tumorcellen losgeraakt. Zelfs werden herhaaldelijk tumorbrokjes aangetoond, waarvan men kon verwachten, dat ze levenskrachtige cellen bevatten. Dat deze in de anastomose of wondvlakten kunnen geraken wanneer het darmlumen wordt geopend, is duidelijk.

Experimenteel heeft VINK [181, 182] dit nader bestudeerd door bij het konijn in het lumen van de dikke darm een suspensie van tumorcellen te brengen, zódanig dat er geen cellen buiten de darm geraakten. Distaal van de punctieplaats werd de darm doorgesneden en vervolgens weer end to end gehecht. Op deze wijze werden 23 konijnen behandeld, die na 4—6 weken werden opgeofferd. In 14 gevallen werd tumorgroei waargenomen, waarvan 3 maal in de naad en 11 maal elders in de buikholte. Bij een tweede proefopstelling werd bij 27 dieren de darm prae-operatief gesteriliseerd; na de operatie werd doorgegaan met het geven van sulfasuccidine of streptomycine. Overigens vond eenzelfde procedure plaats als bij de eerste proef. Nu bleken 15 dieren gezwelgroei te vertonen, waarvan 12 maal in de anastomose en elders en 3 maal uitsluitend elders. Hieruit blijkt niet alleen, dat entmetastasering bij deze proefopstelling mogelijk is, maar ook, dat darmdesinfectie de implantatiekansen in de naad gunstig beïnvloedt.

COHN en ATIK [28] hebben in een recent gepubliceerd onderzoek dit experiment op vrijwel analoge wijze herhaald. Een gedeelte van het colon van een konijn werd tussen twee klemmen geïsoleerd en mechanisch gereinigd. In dit darmgedeelte werd locaal een mengsel van neomycine en tetracycline gebracht gedurende een half uur. Hierna werd de darm ter plaatse weer leeg gemasseerd en werd een tumorcelsuspensie ingebracht, waarna de darm werd doorgesneden en weer end to end gehecht. Bij de controledieren werd het gedeelte van het colon tussen de klemmen gelegen alleen leeggestreken, waarna de tumorcelsuspensie werd ingebracht, de darm gekliefd werd en herstel der continuïteit volgde. Bij de met antibiotica behandelde serie vonden ook deze schrijvers een significante toename van het aantal gevallen dat tumorgroei in de naad optrad; zij konden echter niet met zekerheid vaststellen of hierbij het meerdere trauma, veroorzaakt door de spoeling met antibiotica-oplossing, geen rol speelde, want ook wanneer eenzelfde procedure als bij de met antibiotica behandelde dieren werd gevolgd, waarbij de antibiotica-oplossing echter vervangen werd door physiologisch zout, trad meer tumorgroei in de naad op.

COLE [29, 30, 31, 32] heeft herhaaldelijk maatregelen gepropageerd ter voorkoming van locaal recidief, vooral wat betreft het recidief bij dikke darm tumoren. Volgens deze auteur zou ongeveer de helft der locale naadrecidieven van colon en sigmoid ontstaan door implantatie. Het meer frequent voorkomen van locaal recidief bij abdominale resecties met een

end to end anastomose, wegens carcinoom van het rectosigmoid, in vergelijking met dat bij abdominoperineale resecties, kan niet verklaard worden door uitgroei van achtergebleven tumorweefsel: retrograde metastasering op meer dan ongeveer 2 cm van de tumor ziet men zelden (GOLIGHER et al. [72] op 1500 preparaten in 2% der gevallen) en intramurale uitbreiding naar distaal over wat groter afstand alleen bij zeer anaplastische carcinomen. Zorgt men dus bij de abdominale resectie 5 cm distaal van de tumor te zijn, dan is men tamelijk veilig. Implantatiemogelijkheden zijn er echter minder bij de abdominoperineale resectie: tumor en distale darmdeel worden en masse verwijderd, nadat de anus is dichtgehecht. Proximaal van de tumor is het gevaar voor entmetastasering veel kleiner: GOLIGHER et al. zagen slechts 3 keer op meer dan 2000 colostomieën aangelegd na een abdominoperineale resectie een locaal recidief in de colostomie. Dit is in overeenstemming met het onderzoek van VINK [183], die geen tumorcellen kon aantonen in het spoelsel van aanvoerende lissen, terwijl dat van afvoerende lissen herhaaldelijk tumorcellen bevatte.

KYLE BUSH [106], LE QUESNE en THOMSON [146], HAVERBACK en SMITH [82], BEAHRS et al. [11], JACKSON et al. [91] hebben eveneens bijdragen geleverd tot het probleem van de entmetastasering. Zo ook QUER et al [145], die er nog eens op wijzen, dat haemorrhoïden nog al te vaak worden geattaqueerd zonder een gericht onderzoek op eventueel hogerop gelegen oorzaken. Hun eigen materiaal omvat 1796 patiënten, die in de Mayo Clinic onder behandeling kwamen voor carcinoom van sigmoid, rectum of anus. Hiervan had 7,1% tijdens de periode dat het onontdekte carcinoom reeds symptomen gaf, een behandeling voor haemorrhoïden ondergaan, waarvan meer dan de helft operatief. Bij deze laatste gevallen konden zij 4 maal implantatietumoren waarnemen in het gebied van de linea dentata. Deze gevallen worden uitvoerig en zeer goed gedocumenteerd beschreven. BOREHAM [17] beschrijft 6 gevallen van entmetastasen bij de anus, waarvan 2 na een haemorrhoïdbehandeling, waarbij hogerop de primaire tumor werd gevonden. Voorts legt hij de nadruk op het gevaar, dat gedesquameerde tumorcellen van een door de serosa heengegroeid gezwel kunnen opleveren. Volgens hem zijn het deze cellen, die de oorzaak waren van een locaal recidief in de colostomie na een abdominoperineale resectie, zoals hij tweemaal waarnam. Van „tumorspilling" kon geen sprake zijn: de anus was dichtgehecht, en de darm boven de tumor ingestulpt. Wel was er echter in beide gevallen serosa-doorgroei. Ook POMERANTZ en GARLOCK [143] wijzen op het gevaar, dat van serosa-zijde dreigt, vooral als er enige manipulatie nodig is; evenals CRILE [43] en MOORE [128], welke laatste bij maagcarcinoom in 65% van de gevallen tumorcellen kon aantonen in de peritoneaalholte, en in 36% bij coloncarcinomen, hoewel al deze tumoren curabel leken te zijn tijdens de operatie. Zijn serie is echter klein. ACKER-

MAN en WHEAT [2] geven eveneens goed gedocumenteerde voorbeelden van entmetastasering en wijzen bovendien op het gevaar van naaldbiopsieën bij kankers, waarbij het kapsel wordt doorgeprikt. Uitgroei langs het steekkanaal kan plaats vinden of men zaait zelf uit in het kanaal met de zojuist verkregen cellen. Bij de operatie moet de biopsieplaats (en eventueel steekkanaal) in toto mede verwijderd worden. Beter is het de gehele tumor voor biopsie te verwijderen.

FLEISCHNER en BERENBERG [63] vonden herhaaldelijk hechtmateriaal van de oorspronkelijke operatie in het locale recidief. In twee gevallen was voorts het recidief gezeteld aan de ileumzijde van een ileocolostomie; aan deze zijde is achterblijven van tumorweefsel door onvoldoende resectie vrijwel uitgesloten.

LOFGREN et al. [117] konden bij 98 operatiepreparaten van anterieure resecties van rectum en sigmoid, waarbij de patiënten een locaal recidief gekregen hadden, dit recidief in 76 gevallen niet verklaren, dan door aan te nemen, dat hier implantatiemetastasering in het spel geweest moest zijn. Zij vonden bij vergelijking met een gelijksoortige groep patiënten, die de 5-jaarsgrens gepasseerd waren, dat de recidieffrequentie toenam, naarmate de primaire tumor lager gezeteld was geweest, mogelijk doordat hier moeilijker te opereren was, waardoor een sterker traumatisering optrad met meer kans op verspreiding en implantatie der cellen.

HILBERG et al. [85] onderzochten wondspoelsels bij diverse kankeroperaties waarbij men dacht radicaal te opereren en vonden in 30% der gevallen tumorcellen. SMITH [168] en HARRIS [79], die een soortgelijk onderzoek verrichtten, vooral bij wondspoelsels van epidermoid-carcinoom van hoofd en hals, vonden positieve uitkomsten bij ongeveer 25%. Een duidelijke relatie tussen het vinden van tumorcellen en het vóórkomen van locaal recidief konden zij echter niet aantonen. De spoelsels zijn echter lang niet alle van chirurgisch curatieve ingrepen, zodat een goede beoordeling niet mogelijk is, aangezien men niet weet in welke gevallen een onvoldoende excisie de oorzaak is geweest van het recidief. In ieder geval blijkt hieruit, dat niet elke gemorste kankercel (voorzover deze al levensvatbaar is) een locaal recidief veroorzaakt, maar dat het lichaam met een aantal tumorcellen zelf kan afrekenen.

Hoofdstuk III

PROPHYLAXE VAN IMPLANTATIEMETASTASERING

Men heeft naar wegen gezocht het locaal recidief, ontstaan door implantatie van kankerweefsel, tegen te gaan. Zoals reeds werd vermeld, bepleitten Lambert Lack [107], Ryall [153, 154], Mayo [119] en ook Gerster [69] reeds omstreeks het begin van deze eeuw maatregelen tegen deze uitzaaiing. Deze kwamen in het kort op het volgende neer:

1. uitsnijden van het gezwel in toto, tot ver in het gezonde weefsel.
2. zoveel mogelijk van het electrische mes gebruik maken.
3. indien „tumorspilling" optreedt, het terrein cauteriseren.
4. zowel vóór als tijdens de operatie zo weinig mogelijk en zo zachtzinnig mogelijk manipuleren met de tumor.
5. excisie-biopsieën verrichten waar dit mogelijk is, en geen incisiebiopsieën. Wordt er tumorweefsel gevonden bij een incisieve biopsie, dan de wond cauteriseren (chemisch of thermisch) en sluiten; wisselen van handschoenen en instrumenten, opnieuw afdekken en bij de aansluitende (radicale) ingreep het biopsiegebied in toto mede verwijderen.

De laatste jaren zijn hieraan nog een aantal punten toegevoegd, of zijn de bestaande voorschriften nader uitgewerkt, vooral voor wat betreft de tractus gastro-intestinalis.

a. Zo ging Vink [181] er reeds jaren geleden toe over bij carcinoomoperaties van de dikke darm zo snel mogelijk aan weerszijden van de tumor het darmlumen af te sluiten met navelbandjes, zodat het lumen buiten deze bandjes, waar de darm tenslotte wordt gekliefd en de anastomose gelegd, gevrijwaard wordt van besmetting met tijdens de operatie geëxfolieerde tumorcellen. Cole [125] heeft eveneens herhaaldelijk op het belang van deze afsluiting gewezen. Het bleek, indien men uitstrijkjes maakte van het darmslijmvlies buiten deze bandjes, dat geen kankercellen konden worden aangetoond, terwijl van 8 binnen de bandjes gemaakte preparaten er 7 positief waren. Dit houdt tevens in, dat prae-operatieve lavementen weinig invloed hebben op de tumorcelverspreiding. Was dat wél het geval, dan had men ook buiten de bandjes tumorcellen moeten vinden, en wel in ongeveer de helft der gevallen, gezien de resultaten die men had met uitstrijkjes zónder het gebruik van bandjes, waarbij over een zeer groot darmgedeelte tumorcellen aantoonbaar waren. De aanwezigheid van tumorcellen in het

darmlumen wordt dus vooral bepaald door het manipuleren met de tumor, zoals ook VINK [183] aantoonde.

b. Voorts wees COLE [30, 31] op het belang van snelle onderbreking van de bloedstroom van het tumorbevattende darmgedeelte om eventueel haematogene verspreiding tegen te gaan. Zo spoedig mogelijk moeten de hoofdstammen uit het betreffende gebied worden onderbonden. Dat loslaten en verslepen van kankercellen via de bloedbaan mogelijk is, blijkt uit het onderzoek van STUART-ROBERTS et al. [173,174].

c. GOLIGHER en DUKES [72] spoelen het distale darmgedeelte via de anus gedurende 5 minuten met een sublimaatoplossing van 1 : 500. De sublimaat reikt tot het distale bandje, waaronder de darm gekliefd wordt. Het proximale sneevlak wordt met sublimaat afgebet. Ook BOREHAM [17] en LLOYD-DAVIES [114] gebruiken deze methode. Vooral bij laaggezetelde tumoren, waar het moeilijk is, distaal van de tumor het darmlumen af te sluiten, is deze methode belangrijk. Deze methode is eveneens in de Leidse Heelkundige Kliniek in gebruik; wij zagen geen tekenen van gestoorde wondgenezing, noch vergiftigingsverschijnselen.

d. Ter voorkoming van entrecidief vanaf de serosa-zijde, raden BOREHAM [17] en POMERANTZ en GARLOCK [143] aan, deze zijde van het gezwel zo spoedig mogelijk af te dekken. De laatsten gebruiken hiervoor een doek, van bandjes voorzien in het midden en aan de einden die door het mesenterium gehaald worden en geknoopt. De bandjes aan het eind kunnen dan tevens dienst doen om het lumen af te sluiten.

e. HAVERBACK en SMITH [82] onderzochten in het dierexperiment de mogelijkheid om hechtmateriaal zodanig te behandelen, dat er na contaminatie met tumorcellen toch geen gezwelgroei meer optrad. In een zeer fraai experiment konden deze schrijvers 91,8% van hun controledieren met tumoren enten, door een draad eerst door een tumorcelsuspensie te halen en vervolgens door een achterpoot te trekken. Met een voorbehandelde draad lukte dit slechts in één van de 325 proefdieren. Als impregnatiemiddel voldeed zeer goed picrinezuur 7,3%; een toxisch effect van deze stof werd niet waargenomen.

f. Om een verspreiding van eventueel gemorste tumorcellen tegen te gaan, is het wenselijk het operatiegebied met gazen af te dammen.

g. Voor het sluiten van de wond is het mogelijk door ruim te spoelen met physiologisch zout, reeds een groot deel van eventueel achtergebleven tumorcellen weg te spoelen (KETCHAM [94]).

h. Verder kan men trachten de achtergebleven tumorcellen te doden, waartoe v. BOUWDIJK BASTIAANSE [18] alcohol 96% gebruikte. Ook kan men voor dit doel gebruiken een steriele formaldehyde-oplossing. Met deze laatste stof verrichtten o.a. SHIP en medewerkers [167] dierexperi-

menten. Zij vonden, dat spoeling gedurende 5—15 minuten met 0,5% formaline-oplossing in physiologisch zout van een juist te voren met kankercellen besmette wond, een sterk verminderde groei of in het geheel geen tumorgroei te zien gaf, in tegenstelling tot de bevindingen bij controledieren, die met physiologisch zout gespoeld werden. Bij proeven op muizen bleek 0,05% oplossing reeds voldoende te zijn. Nadelige invloed van 0,5% oplossing op de wondgenezing werd niet gezien, evenmin een blijvende beschadiging van zenuwstammen bij muis, konijn en hond. Uit de publicatie van THOMAS en BROWN [179] blijkt (althans bij de Ehrlich' ascitestumor bij de muis) een 5 mg% stikstof-mosterd-oplossing nog betere resultaten te geven. Wij hebben 0,1% formaldehyde-oplossing in physiologisch zout gebruikt voor het spoelen van de operatiewonden bij carcinoma mammae en carcinomen van hoofd en hals. Onze indruk is, dat de wondgenezing niet nadelig beïnvloed wordt; lever- en nierbeschadigingen namen wij niet waar. Voor intra-peritoneale en intra-pleurale toepassing hebben wij van het formaldehyde geen gebruik gemaakt.

i. Over de werking en de toepassing van kankerchemotherapeutica ter bestrijding van implantatiemetastasen en van eventueel ten gevolge van de ingreep optredende uitzaaiing op afstand, zal nog uitvoerig worden gesproken.

j. Helaas is het nog niet mogelijk de specifieke weerstand van de betrokken patiënt tegen zijn kankercellen te *verhogen,* waardoor het gevaar van enting en metastasering op afstand aanzienlijk zou verminderen. Gelukkig blijkt deze weerstand bij vele patiënten zodanig te zijn, dat zij kunnen afrekenen met een groot aantal kwaadaardige cellen, zodat niet elke achtergebleven levende kankercel uitgroeit tot een recidief. Waar de grens ligt van deze weerstand, is niet bekend.

Het milieu waarin de losgeraakte kankercel of het tumorbrokje belandt, zal invloed kunnen uitoefenen op het al of niet aanslaan hiervan. De levenskansen van een losse tumorcel zullen beter zijn in een rauw wondoppervlak, waar gemakkelijk een goede voedingsbodem gevonden wordt, dan op een intact slijmvlies. Ook kan men zich voorstellen, dat een geïnfecteerd milieu slechtere levenskansen voor de tumorcel met zich meebrengt door necrose en pusvorming en het vrijkomen van toxische producten. Anderzijds is de doorbloeding hier vaak beter.

Hoewel omtrent het vraagstuk van de kans op uitgroei van kankercellen in een al of niet met bacteriën geïnfecteerd milieu nog betrekkelijk weinig onderzoek is verricht, is dit probleem voor de hedendaagse chirurg niet zonder belang, nu bij de darmchirurgie de prae-operatieve darmdesinfectie wordt toegepast. Trad er vroeger betrekkelijk gemakkelijk een bacteriële infectie op in de nabijheid van de naad, tegenwoordig is de ernst en de

frequentie hiervan aanzienlijk verminderd. Men moet zich afvragen of onder deze gewijzigde omstandigheden de levenskansen van gemorste tumorcellen wel dezelfde zijn gebleven. VINK [181, 182] komt door zijn dierexperimenten tot de slotsom, dat de chirurg met de darmdesinfectie inderdaad een tweesnijdend zwaard hanteert en dat, nu de kansen op ernstige bacteriële infecties zijn afgenomen, de kans op implantatiemetastasering in of nabij de naad is toegenomen.

CRILE [43] is dezelfde mening toegedaan en ENGLEBERT DUNPHEY [51] stipt dit probleem eveneens aan, als hij spreekt over een kleiner worden of zelfs tot verdwijnen komen van kwaadaardige gezwellen van de dikke darm na een ontstekingsproces in het gebied van de tumor.

COHN & ATIK [28] konden niet met zekerheid uitmaken of darmdesinfectie alléén de kans op implantatiemetastasering in de naad deed toenemen, of dat ook het trauma hierbij een rol speelde.

Het leek ons van belang om experimenteel te onderzoeken wat de groeikans is van tumorcellen ingebracht in steriel, respectievelijk in opzettelijk geïnfecteerd weefsel, aldus het vraagstuk van een andere zijde benaderend. Een verslag van deze proefnemingen wordt gegeven in het tweede deel van het experimentele gedeelte van dit proefschrift.

Gezien de litteratuurgegevens is de kans op implantatiemetastasering bij darmoperaties eerder toe- dan afgenomen. Een aantal maatregelen, die de kans op deze implantatiemetastasering kunnen doen afnemen, zijn besproken. Hierbij is aan de mogelijkheid om kankerchemotherapeutica als één der prophylactische maatregelen te gebruiken, slechts vluchtig aandacht besteed. Toch kunnen deze hierbij een grote rol spelen, zodat het ons dienstig leek deze stoffen en de mogelijkheden die zij bieden, in de volgende hoofdstukken uitvoeriger te beschouwen.

Hoofdstuk IV

ENIGE KANKERCHEMOTHERAPEUTICA

De laatste jaren heeft men een aantal stoffen leren kennen, die een remmende of dodende werking kunnen uitoefenen op de kankercel, als ze in voldoende concentratie worden toegediend. Helaas is nog geen verbinding bekend die exclusief werkt op de tumorcel; een stof die op kankercellen een schadelijke werking uitoefent, doet dit ook in meer of mindere mate op gezonde cellen, aangezien beide biochemisch zeer nauw verwant zijn. De therapeutische breedte is dan ook klein tot nu toe. Om effect te bereiken moeten deze stoffen toegediend worden in doses, die vaak ernstige bijwerkingen tot gevolg hebben. Eén van de belangrijkste hiervan is de toxische werking op het beenmerg, waardoor een leucopenie en een thrombocytopenie optreedt, terwijl het aantal reticulocyten eveneens kan teruglopen. Voorts moeten gastro-intestinale stoornissen en ulceraties van de slijmvliezen genoemd worden.

Het ligt niet in de lijn van dit proefschrift alle in gebruik zijnde kankerchemotherapeutica te bespreken. Een uitnemend samenvattend overzicht werd gegeven door Farber et al. [55] en eveneens vindt men overzichten of publicaties over afzonderlijke stoffen in de litteratuurlijst onder de nrs. 3, 13, 16, 20, 53, 56, 77, 81, 83, 86, 87, 88, 113, 130, 136, 137, 172, 178, 188, 195, 196. Ter oriëntatie volgt slechts een zeer summier overzicht van enige belangrijke kankerchemotherapeutica.

I. Cytotoxica

A. *Radiomimetica*

1. Alkylerende stoffen:

a. Methyl - bis - (β chloroaethyl) - amine = Stikstofmosterdgas = HN_2

b. Methyl - bis - (β chloroaethyl) - amine - oxyde = N - oxyd Lost = Mitomen

c. p - [Bis - (β chloroaethyl) - amino] d.l. phenyl - alanine = Phenyl - alanine - mosterd = Sarcolysine = Melphalan

d. N,N - Bis - (β chloroaethyl) - N′,0-propyleenphosphorzuurester - diamide = Cyclophosphoramide = Endoxan

e. N,N - Bis - (β chloroaethyl) - p-aminophenyl-boterzuur = C.B. 1348 = Chlorambucil

2. Ethyleeniminen:
   a. 2, 4, 6-Triaethyleenimino-s-triazine = Triaethyleenmelamine = TEM
   b. N,N′,N″ - Triaethyleenphosphoramide = TEPA
   c. N,N′,N″ - Triaethyleenthiophosphoramide = TSPA = ThioTEPA
3. 1, 4 - Bis - (methaansulfonoxy) - butaan = Myleran

B. *Mitosegiften*

Urethanen
Colchicinederivaten (o.a. Demolcin)
Liquor Fowleri

II. Antimetabolieten

A. *Folinezuurantagonisten*
   a. 4-Amino-N^{10}-methylpteroylglutaminezuur = Amethopterin = Methotrexate
   b. 4-Aminopteroylglutaminezuur = Aminopterin

B. *Purineantagonisten*
   a. 6-Mercaptopurine
   b. 6-Thioguanine = 2-amino-6-mercapto-pyrimidine

C. *Pyrimidineantagonisten*

5-Fluorouracil

III. Antibiotica

Actinomycine D
Mitomycine
Puromycine
Azaserine

IV. Hormonen

V. Radioactieve stoffen

De werking van de cytotoxica berust op een directe chemische interactie met bepaalde weefselcomponenten, waarbij de radiomimetica in vele opzichten eenzelfde effect hebben als Röntgen- en radioactieve stralen. De inwerking vindt plaats op de rustende cel of bij de in prophase van de deling verkerende cel, in tegenstelling tot de mitosegiften, die tijdens de metaphase aangrijpen. In beide gevallen treedt een stoornis in de celdeling op.

De tweede groep stoffen werkt volgens het competitieprincipe, waarbij een stof, wat zijn chemische eigenschappen betreft, zo verwant is met een essentiële metaboliet, dat zij wel diens plaats, maar niet zijn functie kan innemen, zodat de celstofwisseling gestoord wordt.

De werking van de antibiotica is nog niet geheel opgehelderd; zij hebben een zeer geringe therapeutische breedte.

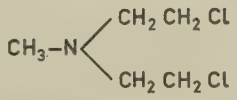
Hormonen kunnen hun werking op kankerweefsel uitoefenen dank zij het feit, dat in een aantal gevallen de gevoeligheid voor deze hormonen bij een gezwel blijft bestaan. Deze werking kan zowel van directe, als van indirecte aard zijn.

Tengevolge van een specifieke weefselaffiniteit voor bepaalde stoffen, die ook na kwaadaardige degeneratie soms blijft behouden, kunnen in een aantal gevallen radio-isotopen worden toegepast (Ariëns [3]).

Aangezien bij onze experimenten gebruik gemaakt is van de chemotherapeutica triaethyleen-thio-phosphoramide (TSPA) en Melphalan, zullen deze nader beschouwd worden, evenals de stof waarmede zij zijn verwant, het stikstofmosterd.

Stikstofmosterd

In 1935 bereidde Ward het tris-(β chloroaethyl)-amine, dat als eerste der stikstofmosterdverbindingen die bij de chemotherapie van kanker in gebruik zijn, kan beschouwd worden (Karnofsky [92], Klopp en Bateman [97]). Goodman en medewerkers gebruikten het methyl-bis-(β chloroaethyl)-amine:



dat in de Angelsaksische litteratuur wordt aangeduid als nitrogen-mustard of HN_2 en nog steeds een van de meest gebruikte verbindingen is. De stof vormt in combinatie met HCl, een stabiel, wit poeder, dat goed in water oplosbaar is. (In Nederland verkrijgbaar onder de naam Mitoxine.) De werking op de cel is in principe gelijk aan die van de Röntgenstraal, hoewel er verschillen zijn, o.a. wat betreft de mutagene werking op de geslachtscellen van Drosophila Melanogaster (Auerbach et al. [4, 5]). Ook herstellen dieren die een LD_{50} HN_2 hebben gekregen en de eerste week overleven, snel en definitief, terwijl ze na een totale lichaamsbestraling nog na 30 dagen kunnen sterven. Voorts is er een sneller herstel van de leucopenie na HN_2 toediening waar te nemen dan na bestraling.

De meest gevoelige weefsels zijn lymphatisch weefsel, beenmerg en darmmucosa. De beenmergremming komt tot uiting in de optredende leucopenie en thrombocytopenie op ongeveer de 7e tot de 21e dag na de toediening. Men moet bedacht zijn op een later optredende anaemie, aan-

gezien de reticulocyten-aanmaak eveneens gestoord kan worden. Eerst nadat de ten tijde van de toediening circulerende perifere erythrocyten zijn afgestorven, komt deze remming tot uiting. De werking op de tractus gastro-intestinalis treedt veel sneller op: reeds een uur na de inspuiting kan misselijkheid en braken optreden. Bij de niet letale gevallen herstelt de darmmucosa zich in enige dagen; het beenmerg is na 4—6 weken weer normaal.

Levercellen schijnen weinig gevoelig te zijn voor HN_2, evenals het nierparenchym.

Er zijn aanwijzingen dat de milt een rol speelt bij de toxiciteit van het stikstofmosterd: honden zijn minder gevoelig voor HN_2 na splenectomie; ook bij muizen kon WHITE [190] soortgelijke waarnemingen verrichten.

Een therapeutische dosis HN_2 heeft weinig invloed op het perifeer of centraal zenuwstelsel; het werkt enigszins para-sympathico-mimetisch, waarschijnlijk door een inactivering van het choline-esterase, waardoor het acetylcholine effect wordt versterkt en geprolongeerd.

De werking op de gonaden is eveneens gering bij een normale dosering: bij de mens is geen duidelijke invloed op de spermatogenese waargenomen. KARNOFSKY [92] vermeldt echter, dat bij rattenfoetussen deformiteiten zijn geconstateerd, indien de moederdieren tijdens de graviditeit HN_2 toegediend kregen. Voorts is bij Drosophila de mutagene werking bekend, zodat men voorzichtig moet zijn met een definitieve uitspraak over de eventuele invloed op de nakomelingschap.

Menstruatiestoornissen worden na toediening van therapeutische doses HN_2 niet gezien.

Volgens SCHNEEWIND en FULLER [163] geeft het stikstofmosterd in de gebruikelijke dosering geen depressie van de bijnieractiviteit die tengevolge van een grote ingreep verhoogd wordt; evenmin zou het de werking van postoperatief toegediend ACTH remmen. Er zijn eerder aanwijzingen, dat de stof een effect heeft niet ongelijk aan dat van ACTH toediening.

Bij directe werking op de huid is het HN_2 blaartrekkend; de mate waarin, is afhankelijk van de concentratie.

Intra-arterieel toegediend kunnen radiomimetische effecten optreden als erytheem, hoofdhaaruitval, later ook schilfering en pigmentatie van de huid. De gewoonlijk gegeven intraveneuse dosis geeft deze bijwerkingen niet te zien.

Het is voorgekomen, dat een tumor, ongevoelig voor Röntgenstralen, nog wel gevoelig was voor HN_2 of een ander radiomimetisch agens. Omgekeerd kan er resistentie tegen deze kankerchemotherapeutica ontstaan, nadat de tumor eerst goed heeft gereageerd. Primaire ongevoeligheid komt eveneens maar al te vaak voor; er bestaat bij de tumoren een hele gevoeligheidsscala, afhankelijk van differentiatiegraad, van graad van mitotische activiteit en vooral van de weefselsoort waarvan de tumor uitgaat. Aan

de ene zijde staat het lymphatisch- en haemopoëtisch weefsel, aan de andere zijde het spierweefsel, dat nauwelijks reageert op HN_2.

Om een therapeutisch effect te bereiken, is het noodzakelijk, de hoogst toelaatbare dosis HN_2 toe te dienen. Deze bedraagt ongeveer 0,4 mg/kg lichaamsgewicht, toe te dienen inéén of over 2 tot 4 dagen verdeeld. Voor operatiepatiënten is 0,3 mg/kg lichaamsgewicht als een veilig maximum te beschouwen.

Stikstofmosterd kan intraveneus of intra-arterieel toegediend worden in een oplossing van 1 mg per cc physiologisch zout; locaal toegediend zou een oplossing van 1 mg op 20 cc physiologisch zout de gunstigste concentratie zijn (Thomas & Brown [179]) behalve bij intraperitoneaal gebruik, waar het misschien wenselijk is een oplossing van 1 mg op 50 cc physiologisch zout te gebruiken om mesotheelbeschadiging met als gevolg adhaesievorming, te voorkomen. Bij een leucocytenaantal $< 5000/mm^3$ zal men zeer voorzichtig moeten doseren; eveneens geldt dit voor oudere mensen en personen met een overgewicht. In het algemeen moet er rekening mee worden gehouden, dat bij een dosering van meer dan 30 mg in totaal, ernstige beenmergdepressies te verwachten zijn. In de meeste gevallen herstelt het beenmerg zich na enige weken. Soms evenwel laat een volledige terugkeer tot de norm veel langer op zich wachten. Eerst als het bloedbeeld weer geheel normaal is, kan men overgaan tot het geven van een tweede serie injecties.

Er zijn aanwijzingen, dat het HN_2 in het lichaam snel wordt afgebroken; zo konden Karnofsky [92] en medewerkers aantonen door afsluiting van de circulatie van de achterpoten van ratten en konijnen gedurende 2—15 minuten na een intraveneuse injectie van HN_2 proximaal van de afsluiting, dat het beenmerg in de femora niet werd aangetast, dit in tegenstelling tot de ernstige afwijkingen van sternum- en humerusmerg. Kennelijk was binnen de genoemde tijd alle HN_2 onwerkzaam geworden, zodat dit bij herstel van de circulatie geen invloed meer uitoefende op het femur-beenmerg. De observaties van Creech en medewerkers [39] zijn hiermede in overeenstemming.

Mc. Allister et al. [120] vonden, dat het bloed van apen, ingespoten met HN_2, slechts gedurende 1—5 minuten na de injectie een toegenomen cytotoxiciteit voor de weefselkweek vertoonde. Daarentegen bleek een HN_2 oplossing in physiologisch zout, menselijk plasma of -bloed deze cytotoxiciteit vele uren te behouden. Zelfs bij de hoogsttoelaatbare intraveneuse doses, ziet men in de litteratuur geen genezing beschreven van een duidelijk vastgestelde kanker, hoewel de palliatie soms aanzienlijk is. Men heeft naar wegen gezocht, de doses te kunnen verhogen. Eén ervan is het toedienen van een antidotum, maar tot een succes heeft dit nog niet geleid (Hatiboglu [80]).

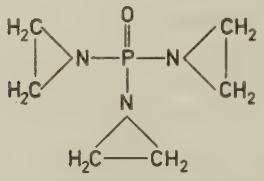
Mogelijk is meer te verwachten van het isoleren van een deel van het lichaam waar de tumor gezeteld is en dit te doorstromen met een kanker-

chemotherapeuticum, zodat ter plaatse van de tumor een zeer hoge concentratie kan bereikt worden, terwijl de rest van het lichaam onttrokken blijft aan de nadelige invloed van de stof.

TSPA

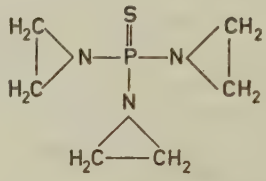
De phosphoramiden, gesynthetiseerd omstreeks 1950 in de American Cyanamid Research Laboratories, hebben in principe eenzelfde werking als het HN_2. Hun tumorspectrum is echter anders, terwijl er ook verschillen zijn in giftigheid.

Tot de groep behoren o.a.



N-N′-N″-triaethyleenphosphoramide
= TEPA

&



N-N′-N″-triaethyleen-thiophosphoramide
= TSPA

TSPA [126] is oplosbaar in physiologisch zout; eventueel kan een speciale bufferoplossing gebruikt worden. Gewoonlijk wordt 15 mg opgelost in 1 cc oplosmiddel. Het is mogelijk deze stof gedurende langere tijd per os toe te dienen in een dosering van 5—10 mg 3 maal per week.

Locaal in een tumor gespoten kan wekelijks 30 mg toegediend worden. Het is dan wenselijk vooraf eerst een locaal anaestheticum te geven, aangezien de inspuiting pijnlijk kan zijn. Deze wijze van toedienen waarborgt een zo groot mogelijke concentratie juist op de plaats waar het zijn werking moet ontvouwen. Ook kan het ingebracht worden in pleura-, pericard- of buikholte, na het eventueel aanwezige vocht eerst afgezogen te hebben. De gebruikte dosis is hier eveneens 30 mg per keer.

Intraveneus toegediend, is het mogelijk ineens of verdeeld over enige dagen een dosis van in totaal 0,8 mg/kg lichaamsgewicht te geven. Wil men het TSPA gedurende langere tijd intraveneus toedienen, dan is een bruikbaar doseringsschema de eerste week 1 of 2 keer 15 mg en verder eens per week 15 mg. Aangezien de stof eenzelfde werking op het beenmerg heeft als HN_2, is zeer regelmatige controle van het bloedbeeld, inclusief het reticulocytenpercentage en het thrombocytenaantal, vereist. Bij een daling der leucocyten onder 4000/mm³ moet de dosis worden verkleind; bij een daling onder 2500/mm³ moet de toediening gestaakt worden tot het beenmerg zich heeft hersteld.

De aanlooptijd is vrij lang, dat wil zeggen dat eerst 8–40 dagen na de toediening tumorregressie is te zien en de patiënten subjectieve verbetering voelen. Bij een goede reactie is het gewenst een onderhoudsdosis te blijven geven, voorzover de toestand van het bloedbeeld het toelaat. De bijwerkingen blijven vrijwel beperkt tot de beenmergdepressie; misselijkheid en braken treden zeer zelden op, zodat TSPA geschikt is om poliklinisch toegediend te worden, mits er een regelmatige bloedbeeldcontrole plaats vindt. In een aantal gevallen is het gelukt vochtafscheiding van neoplastische oorsprong in buik- pleura- of pericardholte door één of soms meerdere injecties met TSPA voorgoed tot verdwijnen te brengen. Vooral het mamma- en ovariumcarcinoom blijken in dit opzicht tot de meest gevoelige kankers te behoren (Bateman et al. [8], Weisberger [189]).

Ook bij andere localisaties van mamma- en ovariumcarcinoom bleken deze tumoren in een betrekkelijk groot aantal gevallen goed te reageren. Zo rapporteerden Bateman en Carlton [9] een of andere vorm van objectieve verbetering bij 81 van 122 patiënten met ver-voortgeschreden mammacarcinoom, terwijl bijna 100% zich subjectief beter voelde. Ook Bateman en Winship [10] en Wright [198] rapporteerden gunstige resultaten. Op andere gezwellen, uitgezonderd melanomen, tumoren van het centrale zenuwstelsel en de ziekte van Hodgkin, heeft het TSPA geen sterke tumorremmende werking (Bateman [7], Wright et al.[197], Moore et al.[130], Roswit [152], Conway en Griffith [37], Tullis [180], Humphrey en Hitchcock [89]).

Hoewel tumoren van de tractus gastro-intestinalis in het algemeen uitgesproken slecht reageren, beschrijven Ross en Rodriguez [151] een patiënt met een cardiacarcinoom, dat van non-resectabel tot chirurgisch curabel werd in de loop van 8 maanden.

Evenals bij het stikstofmosterd is een resistent worden van de behandelde tumoren beschreven.

Phenyl-alanine-mosterd

Het p- [bis-(β chloroaethyl)-amino] d.l.phenyl-alanine-HCl

gewoonlijk genoemd phenyl-alanine-mosterd of sarcolysine, werd in 1953 door Larionov in Moskou gesynthetiseerd. De l. vorm van dit racemisch mengsel, die vooral werkzaam is, werd kort erna gesynthetiseerd door Howard Smith in Londen (Melphalan).

De stof bleek in het dierexperiment een grote activiteit te bezitten tegen sarcomen. Men slaagde er zelfs in, bepaalde rattensarcomen geheel tot verdwijnen te brengen, zelfs nog, indien de therapie eerst op de 25ste dag

na de enting werd ingesteld (LARIONOV en medewerkers [108, 109, 110], MURRAY-LUCK [138]). De werking op het beenmerg bleek in principe dezelfde te zijn als die van HN_2, echter zou de toe te dienen dosis om quantitatief eenzelfde remming te verkrijgen, het vijfvoudige van die van HN_2 bedragen.

De binding van de bis-(β chloroaethyl)-aminogroep aan aminozuren geeft een verandering van het tumorspectrum en een toename van de selectiviteit te zien, in vergelijking met HN_2.

Het schijnt vooral goed te werken bij de ziekte van Kahler, op Ewing-tumoren, seminomen en reticulosarcomen, terwijl ook het maligne melanoom er zeer goed op reageert, zoals uit de resultaten van de groep van CREECH [40] blijkt.

LARIONOV [111] raadt aan, hoge doses toe te dienen, b.v. 50 mg sarcolysine intraveneus eens per week, gedurende enige weken. Na een tussentijd van een of twee maanden wordt dit nog 1—2 maal herhaald, ook al zijn er geen tekenen van een rechute, alles uiteraard onder strenge controle van het bloedbeeld. Opgelost in propyleenglycol is het zonder bezwaar in de bloedbaan of ter plaatse in te brengen. Desgewenst is het na oplossen in propyleenglycol verder te verdunnen met physiologisch zout. Dit laatste is aan te raden als men de stof in een lichaamsholte wenst te brengen, zodat contact van de gehele oppervlakte met het chemotherapeuticum kan plaats vinden. De door LARIONOV opgegeven dosering lijkt ons aan de hoge kant te zijn, want wij zagen bij een dosering van 0.8 mg/kg lichaamsgewicht in totaal, gegeven in het beloop van enige dagen, reeds leucocytendalingen tot 2000/mm^3. Ernstige thrombocytendalingen zagen wij niet. De daling treedt ongeveer na één week op en houdt enige weken aan; het lijkt ons daarom gevaarlijk, indien er reeds een daling is opgetreden, opnieuw een betrekkelijk hoge dosis te geven, zoals LARIONOV voorstelt, aangezien niet te voorspellen is of het leucocytenaantal niet tot zeer lage waarden zal zakken. Wij hebben ons dan ook beperkt tot doses van 25 mg éénmaal per week, als wij de stof gedurende langere tijd poliklinisch wensten te geven. Ook per os is de stof toe te dienen in een dosis van 2 mg/kg lichaamsgewicht in totaal. Eerst als het beenmerg zich hersteld heeft, kan een nieuwe kuur gegeven worden.

Hoofdstuk V

KANKERCHEMOTHERAPIE IN HET DIEREXPERIMENT

Uit het voorafgaande litteratuuroverzicht is gebleken hoe een chirurgische ingreep aan een kwaadaardig gezwel, zelfs als deze in principe curatief zou kunnen zijn, uitzaaiing en implantering tot gevolg kan hebben.

In het nu volgende zal nagegaan worden of er in de litteratuur aanwijzingen te vinden zijn of kankerchemotherapeutica wellicht een rol kunnen spelen bij het voorkómen, althans doen afnemen van deze gevolgen van de operatie, waarbij een ingrijpen dat curatief had kunnen zijn in letterlijke zin de kiem legt voor een nieuwe uitgroei. Eveneens zal worden onderzocht of er een mogelijkheid bestaat, dank zij deze stoffen, een gezwel dat niet geheel verwijderd kon worden, alsnog geheel tot verdwijnen te brengen.

Indien dat het geval zou zijn, is het misschien ook mogelijk reeds uitgezaaide, nog kleine, metastasen te vernietigen. Hierdoor zou door een combinatie van chirurgie en chemotherapie de mogelijkheid een gezwel radicaal uit te roeien, zeer vergroot worden. Helaas moest reeds vastgesteld worden, dat grotere tumoren c.q. tumorresten en macroscopisch zichtbare metastasen niet definitief tot verdwijnen te brengen zijn met de tegenwoordig bekende chemotherapeutica, indien deze intraveneus of per os worden toegediend. Mogelijk dat intra-arteriële toediening, of hoge doses, gegeven in een geïsoleerd gebied, betere resultaten zullen geven.

In 1936 experimenteerden Warren en Gates [186] met tumorcellen, die bij ratten intraveneus werden ingespoten. Het bleek, dat in een groot aantal gevallen tumorgroei optrad buiten de inspuitingsplaats, terwijl locaal geen groei werd waargenomen; de ontstane tumoren konden dus niet secundair aan een primair focus zijn ontstaan. Het percentage dieren, dat tumorgroei vertoonde, was recht evenredig met het aantal ingespoten tumorcellen. Reeds 6 uren na de inspuiting kon ingroei in het extravasculaire weefsel worden waargenomen, gewoonlijk via de (minder resistente) capillairwand; er vond dus een snelle perivasculaire nesteling plaats.

Ook Overstreet en Mc Donald [139] konden bij proeven met dezelfde tumor aantonen, dat de groei van uitgezaaide kankercellen in relatie staat tot het aantal ingebrachte levende cellen, zoals het aantal bacteriën in verband staat met de ontwikkeling van een infectie bij de gastheer. Hun formulering laat tevens ruimte open voor een factor virulentie van de in de bloedbaan gebrachte tumorcellen.

Cruz et al. [44] spoten tumorcellen in een tak van de vena portae bij ratten en onderzochten de metastasering in de lever. Een serie dieren werd

niet met chemotherapeutica behandeld, een tweede groep dieren kreeg HN_2 0,5 mg/kg lichaamsgewicht toegediend, respectievelijk direct na de enting intraportaal, een uur er na intraveneus en een uur er na intraperitoneaal.

Bij alle behandelde dieren trad een sterke remming op van de ontwikkeling van haematogene levermetastasen. Grote verschillen in de drie subgroepen van de met stikstofmosterd behandelde dieren waren er niet.

Soortgelijke experimenten werden beschreven door Mc. Donald et al. [123], waarbij HN_2, resp. TSPA werd ingespoten. Het TSPA bleek in een dosering van 2 mg/kg lichaamsgewicht werkzamer te zijn dan HN_2, waarvan 0,5 mg/kg lichaamsgewicht werd toegediend. Beide stoffen waren minder effectief wanneer tevoren 220.000 cellen per cc waren ingebracht, dan wanneer de helft hiervan werd ingespoten. Bracht men slechts 1000 cellen per cc in, dan trad er ook bij de controledieren geen tumorgroei op, dus het proefdier was in staat zelf af te rekenen met een aantal kankercellen. Dit is in overeenstemming met wat o.a. Engell waarnam bij de mens. Voorts was het de schrijvers gebleken, dat, wanneer pas 48 uur na de inoculatie kankerchemotherapeutica werden toegediend, dit het aantal gevallen dat tumorgroei optrad niet meer beïnvloedde.

Kramer en Schatten [100, 101, 162] stelden in het dierexperiment vast, dat het verwijderen van een primaire tumor (gezeteld op een extremiteit) een versterkte groei van longmetastasen tot gevolg had. Werd nu TSPA 6 uur na het wegnemen van de primaire tumor intraperitoneaal toegediend in een dosering van 10 mg/kg lichaamsgewicht, dan konden de nadelige gevolgen van deze exstirpatie worden voorkomen: de behandelde groep vertoonde minder dieren met longmetastasen en in de gevallen dat er toch metastasering was opgetreden, waren deze kleiner in aantal en afmeting dan bij de controledieren.

In een tweede serie experimenten met TSPA ter preventie van experimentele longmetastasen, werden variërende doses TSPA toegediend op diverse tijdstippen na een tumorenting in een staartvene. Het bleek, dat er minder longmetastasen werden geteld naarmate er meer TSPA werd ingespoten. Bij toediening in één enkele dosis omstreeks de tweede dag na de inoculatie, werd in het algemeen het beste effect verkregen; bij inspuiting na dit tijdstip nam het resultaat snel af. Dit was eveneens het geval als het TSPA langer dan 30 minuten vóór de inoculatie met tumorcellen was gegeven. Bij de proeven, waarbij multiple doses TSPA werden gegeven bleek, dat de beste resultaten verkregen werden bij toediening hiervan op de dag van de enting en tijdens de eerste drie dagen erna. Het voordeel was nu, dat een van de doses werd gegeven in de meest gevoelige periode, een tijdstip, dat niet met zekerheid kan worden vastgesteld, maar dat volgens de schrijvers ongeveer zou samenvallen met het tijdstip dat de cel zich nestelt, waardoor er een verandering in het celmetabolisme zou optreden, wat een grotere gevoeligheid voor het chemotherapeuticum met zich mee zou bren-

gen. De gesepareerd toegediende doses bleken additief te werken, zodat nu én de totale dosis geheel benut werd en bovendien op het gunstigste moment een deel van de stof kon worden toegediend.
Moore en Kondo [131] wijzen eveneens op het belang van toediening op het juiste ogenblik. In het algemeen moet, volgens deze schrijvers, 48 tot 72 uur na de enting wel als grens worden gesteld. Deze onderzoekers menen, evenals Mc Donald et al. [122] en Thomas en Brown [179], dat de nog zwervende cel gevoeliger is dan de reeds genestelde cel, wat de minder goede invloed van chemotherapeutica op grotere tumoren zou verklaren.

Mogelijk spelen hier verschillende factoren een rol, zoals het gemakkelijker bereikbaar zijn van de losse cel of het tumorbrokje voor het chemotherapeuticum en een nog niet aangepast zijn van de tumorcellen aan de weefsels van de gastheer; voorts zal de toename van het totale aantal aanwezige tumorcellen tengevolge van celdeling, eveneens het resultaat beinvloeden. Ook hier bleek weer, dat de werking van de stof omgekeerd evenredig was met het aantal ingebrachte cellen: een kleine groep cellen kon met een bepaalde hoeveelheid HN_2 geheel onwerkzaam worden gemaakt; grotere aantallen van dezelfde soort niet meer, en in deze gevallen leefden de behandelde dieren niet langer dan de controlegroep. Zelfs kunnen de kankerchemotherapeutica een averechtse werking uitoefenen door de weerstand van het organisme te doen afnemen met juist kans op snelle metastasering. Zo resulteerde toediening van kort werkende stoffen vóór de inoculatie of lange tijd erna, in meer metastasen. Ook het af en toe geven van kleine doses kan dit gevaar doen toenemen.

Ketcham [94] heeft dit probleem eveneens aangeroerd: hij behandelde in het experiment wonden, vóór hierop een tumorcelsuspensie werd aangebracht, met Clorpactin XCB (een Ca-hypochloride oplossing) en vond juist een sterkere tumorgroei optreden dan bij de controles, en wel des te sterker naarmate de stof langer te voren was geappliceerd. Deze „pretreatment-accentuation" is zeer belangwekkend; men kan zich iets dergelijks ook bij kankeroperaties voorstellen, waar alleen de wond wordt gespoeld met een tumorceldodende stof. Kankercellen die nog in de bloedbaan circuleren, kunnen hierna alsnog het wondgebied bereiken en er dan misschien beter nestelen. Het zal dus veiliger zijn ook een chemotherapeuticum intraveneus toe te dienen om eventueel in de bloedbaan zwervende cellen eveneens te elimineren. De schrijver vermeldt echter experimenten van Laszlo, waarbij bleek, dat indien eerst het Clorpactin intraperitoneaal werd toegediend en enige tijd later een tumorsuspensie subcutaan werd geënt, er eveneens een groeiversnelling van de subcutane tumor optrad, wat niet op een locaal proces, maar op een aantasten van een intrinsiek afweermechanisme duidt.

Larionov [111], Druckrey [46, 47] en Lo [115] hebben waargenomen, dat naarmate er een grotere hoeveelheid tumorweefsel onschadelijk moet worden gemaakt, het resultaat slechter is. Indien het mogelijk zou zijn bij

een grotere hoeveelheid tumorweefsel ook meer chemotherapeuticum toe te dienen, zouden de resultaten waarschijnlijk even goed blijven, maar de grote giftigheid der stoffen maakt dit onmogelijk.

Voorlopig kan men dan ook alleen succes verwachten bij gedisseminеerde, kleine haarden of bij een zeer kleine hoeveelheid achtergebleven tumorweefsel c.q. losse cellen, zoals DRUCKREY concludeert. Operaties onder chemotherapeutische bescherming kunnen daardoor wel zin hebben.

Lo nam bij ratten met sarcomen van 20 tot 25 gr alle zichtbare tumorweefsel weg. Desondanks stierf binnen 3 weken 60% der dieren aan locaal recidief en/of metastasen. Gaf hij daarentegen de eerste 4 dagen postoperatief intraveneus 0,5 mg N-oxyd Lost, dan bleven alle dieren in leven. Zelfs werd volledige genezing gezien als de tumoren niet geheel verwijderd waren. Zonder operatie gaf N-oxyd Lost genezing bij tumoren die minder dan 5 gram wogen bij de aanvang van de behandeling. Was de tumor bij het begin der behandeling zwaarder dan 10 gr, dan werd weliswaar een groeiremming, doch geen genezing verkregen.

SHAPIRO en FUGMANN [164,118] gingen eveneens de relatie na tussen de grootte van een tumor en het effect van het chemotherapeuticum. Muizen werden subcutaan geënt met een mamma-adenocarcinoomcel-suspensie. Begon men 24 uur na de enting met het toedienen van 6-Mercaptopurine, dan verkreeg men 57% genezingen. Dit daalde tot 26% als na 8 dagen met de therapie begonnen werd en er werden geen genezingen geboekt als eerst 15 dagen na de enting de stof werd toegediend. De schrijvers toonden voorts aan, dat dit resultaat niet samenhing met de levensduur van de tumor noch met de massa, maar uitsluitend afhing van de totale hoeveelheid aanwezige tumorcellen: reseceerde men grote tumoren partieel, zodat ze kleiner werden dan 8 dagen oude gezwellen en gaf men direct hierna weer de standaardtherapie, dan verkreeg men wederom een groot aantal genezingen. Dat de totale hoeveelheid tumorcellen die aanwezig is, en niet de massa van elke tumor afzonderlijk het resultaat bepaalt, blijkt uit hun experiment waarbij een muis met een 15 dagen oude tumor opnieuw geënt werd. 24 Uur later werd de behandeling ingesteld met als resultaat 14% genezingen van de kleine tumor. Na enucleatie van de oude tumor alvorens te behandelen, steeg dit percentage tot 72%, waaruit blijkt dat het aantal cellen dat in totaal aanwezig is de werkzaamheid bepaalt en niet de massa van elke tumor afzonderlijk.

In een ander experiment werden enige tumoren van rat en muis behandeld met diverse chemotherapeutica, waarbij telkens 4 groepen met elkaar werden vergeleken: onbehandeld — alléén chirurgisch behandeld — alléén chemotherapie en ten slotte een combinatie van chemotherapie en chirurgie, waarbij de tumor sub-totaal werd verwijderd. Bij de op de laatste wijze behandelde groep, bleek een zeer significant groter aantal genezingen voor te komen; dit gold voor alle bij deze proef gebruikte chemotherapeutica.

Hoofdstuk VI

KANKERCHEMOTHERAPIE IN DE CHIRURGISCHE KLINIEK

De experimenteel gevonden aanwijzingen, dat bepaalde stoffen een uitgroei van tumorcellen of tumorbrokjes kunnen verhinderen, zelfs een kleine tumor tot verdwijnen weten te brengen, worden in de kliniek reeds bestudeerd. Gestoorde wondgenezing ten gevolge van de gebruikte kankerchemotherapeutica worden niet of nauwelijks in de litteratuur vermeld. Weliswaar namen Farhat et al. [57, 58] bij hun experimenten wel een nadelige invloed van HN_2 waar op de treksterkte van vergroeide, 7 dagen oude wonden, hetgeen niet werd waargenomen na de toediening van TSPA, maar bij klinische toepassing van HN_2 wordt dit niet bevestigd. (Moore en Kondo [131], Kredel [123], Benson et al. [12]).

Wij gebruiken voor wondspoelingen oplossingen van HN_2 van 1 mg op 20 cc physiologisch zout, zonder dat dit een toename van wondstoornissen doet zien; ook bij intraveneus- en intraperitoneaal gebruik namen wij dit niet waar. Wel kan ten gevolge van een leucocytendepressie een infectie heftiger verlopen. Dit is een van de grootste post-operatieve gevaren bij de toepassing van kankerchemotherapeutica. Daarnaast moet de thrombocytopenie genoemd worden, die een verlenging van de bloedingstijd tot gevolg kan hebben.

Er zijn aanwijzingen, dat patiënten die als adjuvans bij de operatie een kankerchemotherapeuticum kregen toegediend, ten gevolge van de beenmergdepressie, postoperatief ongeveer 1 l bloed méér nodig hebben dan een vergelijkbare controlegroep (Morales et al. [134], Mrazek et al. [135]).

Het schijnt, dat operatiepatiënten gevoeliger zijn voor stikstofmosterd dan niet geopereerde patiënten; mogelijk speelt hier de extra belasting van de ingreep een rol. (Morales en Mc. Donald [133]; Cruz et al. [44]).

Oorspronkelijk werd het HN_2 tijdens en vlak na de operatie toegediend in een totale dosis van 0,4 mg/kg lichaamsgewicht en het TSPA tot totaal 0,8 mg/kg lichaamsgewicht. Gezien de reacties van de patiënten moet dit wel als het maximum beschouwd worden, zoals ook onze eigen ervaring is. Het is veiliger de doses wat lager te nemen, zoals inmiddels ook is geschied in de V.S., waar men sinds enige jaren bezig is met een zeer uitgebreid statistisch onderzoek naar de waarde van enige kankerchemotherapeutica als adjuvans bij kankeroperaties. Het doel is, te onderzoeken of kankerchemotherapeutica (die slechts palliatieve waarde hebben bij vérvoortgeschreden kankers) curatief kunnen zijn bij gebruik

in een vroeg stadium c.q. bij weinig achtergebleven tumorweefsel en na te gaan, of de eindresultaten van kankeroperaties door het gebruik van deze stoffen verbeterd kunnen worden. De gebruikte dosering is voor TSPA 0,6 mg/kg lichaamsgewicht en voor HN_2 0,3 mg/kg lichaamsgewicht. Tijdens de operatie wordt van deze totale dosis de helft toegediend en op de eerste en tweede dag postoperatief elk een kwart van het totaal. De toedieningswijze postoperatief is uitsluitend intraveneus; durante operationem wordt bij buikoperaties de helft van de die dag toe te dienen dosis in een tak van de vena portae gespoten, de andere helft opgelost in physiologisch zout via een catheter in de buikholte gebracht. Voor longtumoren is dit respectievelijk intraveneus en intrapleuraal, terwijl bij andere kankeroperaties alles intraveneus wordt toegediend. Patiënten met uitgangs-leucocytenwaarden $< 5000/mm^3$ en thrombocyten $< 150.000/mm^3$ vallen buiten de serie. Bij een lichaamsgewicht uitgaande boven 120% van het ideale gewicht wordt niet meer dan een berekende dosis voor 120% gegeven (SHIMKIN & MOORE [165], Protocol for a cooperative study to evaluate the therapeutic effectiveness of chemotherapy as an adjuvant to surgery in the treatment of cancer. Jan.1.1958).

COLE [33], die eveneens een dergelijk onderzoek verricht, geeft zijn patiënten zo mogelijk elke vier maanden een nieuwe kuur met HN_2 gedurende het eerste jaar. Het tweede jaar wordt, indien het bloedbeeld het toelaat, maandelijks TSPA toegediend. Hij geeft alle patiënten die behandeld worden post-operatief antibiotica. Wij hebben dit niet gedaan, aangezien men dit nog altijd kan overwegen als het leucocytenaantal ernstig gaat dalen, afgezien van het twijfelachtig nut van prophylactische toediening. De voorlopige resultaten van de werkgroep van COLE worden medegedeeld door MRAZEK et al. [135]. Zij beschrijven een serie van 136 patiënten (met een observatieperiode van 3 weken tot 3 jaren) waarvan de ene helft niet behandeld werd, de andere helft wel.

De complicaties treden vooral op bij dikke mensen; zij betreffen bijna altijd de beenmergdepressie met zijn gevolgen. Van de in totaal 74 patiënten met mammacarcinoom hebben 5 van de behandelde en 12 van de controlepatiënten een recidief gekregen. Hiervan zijn respectievelijk 1 en 7 patiënten overleden. Alle patiënten met een recidief hadden bij de operatie okselmetastasen; de gemiddelde tijd waarna het recidief optrad, verschilde niet in beide groepen. Uit de overige gevallen, die colon- en rectumcarcinomen betreffen, zijn geen conclusies te trekken, aangezien er hier in beide groepen nog zeer weinig recidief is opgetreden. Hoewel de cijfers bij de mammacarcinomen wijzen op een gunstig effect, kan hieruit toch niets met enige zekerheid geconcludeerd worden. Hiervoor is trouwens de observatieperiode ook nog veel te kort. Het onderzoek is echter van het grootste belang, aangezien alleen een groot opgezet en betrouwbaar statistisch onderzoek de bij de dierproeven verrichte waarnemingen kan toetsen bij de patiënt.

Men heeft naar wegen gezocht om meer van het kankerchemotherapeuticum ter plaatse van de tumor te brengen, zonder groter risico voor de patiënt dan wanneer het intraveneus wordt ingebracht. KLOPP et al. [95, 96] zijn reeds in 1950 begonnen met toediening van stikstofmosterd langs intra-arteriële weg, om te trachten op deze wijze een hoge locale concentratie te verkrijgen, zonder dat de algemene vergiftigingsverschijnselen het toelaatbare maximum zouden overschrijden. Hoewel hoge doses gegeven werden, zagen de schrijvers geen ernstige beenmergdepressies; de resultaten waren, in vergelijking met de intraveneuse toedieningswijze, goed. Ook anderen hebben van deze methode gebruik gemaakt o.a. BIERMAN et al. [14], COOK [38] en SULLIVAN et al. [176].

Voortbouwend op het door KLOPP ontwikkelde beginsel om méér chemotherapeuticum ter plaatse van de tumor te brengen en te houden tot het uitgewerkt is, met minder toxische bijwerkingen op beenmerg en tractus gastro-intestinalis, hebben CREECH en medewerkers [39 t/m 42, 78, 102, 149, 170, 171], later gevolgd door anderen [84, 166, 194], de regionale perfusie ontwikkeld, waarbij een lichaamsdeel van de algemene circulatie wordt geïsoleerd en doorstroomd via een extra-corporeel circuit, waarin het chemotherapeuticum wordt toegediend. CREECH oxygeneert bovendien het bloed in dit circuit, waardoor het effect van de toegediende stoffen op de tumor nog versterkt zou worden (RYAN et al. [155], GRAY [74], CHURCHILL-DAVIDSON [27], AUERBACH en MOSER [4]). De voordelen van deze methodiek zijn:

1. een hogere concentratie in de geperfundeerde weefsels is mogelijk
2. er is een relatief geringe toxiciteit op de weefsels buiten het geperfundeerde gebied
3. het agens wordt intra-arterieel toegediend
4. de algemene weerstand wordt niet aangetast
5. de hogere O_2 spanning die men in het geïsoleerde deel kan verkrijgen, heeft mogelijk een gunstig effect.

De perfusietechniek kan gebruikt worden:

1. als adjuvans bij de chirurgische standaardtherapie
2. als therapie van slechts gedeeltelijk resectabele tumoren
3. ter omzetting van een niet-resectabel in een resectabel gezwel
4. als palliatie bij niet-resectabele tumoren
5. te zijner tijd, als er nog werkzamer stoffen zijn gevonden, misschien als primaire therapie.

Het voordeel van deze methode is, dat niet alleen de absolute hoeveelheid van het te gebruiken chemotherapeuticum verhoogd kan worden, aangezien er minder gevaar is voor de weefsels buiten het geïsoleerde gebied, maar dat de gebruikte hoeveelheid agens nu ook geheel ten goede

komt aan het zieke lichaamsdeel, zodat de concentratie van de stof hier vele malen hoger kan zijn dan bij intraveneuse toediening.

Men zal zoveel mogelijk een stof moeten kiezen, waarvoor de tumor gevoelig is. Voor b.v. mammatumoren zal men zeker een poging met TSPA (eventueel in combinatie met phenyl-alanine-mosterd) moeten wagen; voor melanomen neme men het voor deze tumoren zeer specifieke phenyl-alanine-mosterd.

Overigens ontbreekt ons nog steeds een practische mogelijkheid tot het nagaan van de tumorgevoeligheid; pas wanneer wij weten voor welke stof de zeer bepaalde individuele tumor die wij willen behandelen, gevoelig is, zal de perfusie het succes kunnen hebben, dat zij belooft. Dat de weefselkweek hierbij een rol zal spelen is waarschijnlijk, maar deze vergt tijd; dit is niet zo ernstig bij palliatieve chemotherapeuticum-toediening, wel echter bij het geven van deze stoffen als adjuvans bij een mogelijk curatief-chirurgische ingreep, zeker wanneer men er van uitgaat, dat een biopsie (indien deze al mogelijk is) enige tijd vóór de ingreep zoveel mogelijk vermeden moet worden. Een perfusie, en in het algemeen alle toediening van kankerchemotherapeutica, die gericht is op ondersteuning van een in principe chirurgisch-curabel gezwel krijgt minder zin, naarmate hij langer post-operatief wordt toegepast, zoals uit het experimentele onderzoek is gebleken. Als grens zou men kunnen aannemen, dat men binnen 48 uur geïnformeerd moet zijn. Maar dit is zelfs nog te lang, wanneer men wil perfunderen met maximum effect; bovendien is het wel zeer bezwaarlijk de patiënt de volgende dag wéér te opereren.

De gevaren, verbonden aan deze perfusies, betreffen in hoofdzaak de kans op een niet volledig afsluiten van het te doorstromen lichaamsdeel, waardoor toch een deel van de toegediende stof in de rest van het lichaam doordringt, met kans op ernstige vergiftigingsverschijnselen. Bij perfusies, niet de extremiteiten betreffende, is het niet mogelijk de gehele collaterale circulatie af te sluiten, zodat hier altijd een lek optreedt, hetgeen een grens stelt aan de hoeveelheid toe te dienen chemotherapeuticum in het systeem. Voorts brengt de operatie op zich zelf eveneens een zeker risico met zich mee, aangezien grote bloedvaten moeten worden gecanuleerd. Tenslotte kunnen toxische producten, in korte tijd vrijgekomen door het necrotiseren van gezwelmassa, leiden tot ernstige post-operatieve stoornissen. Toch is het deze methode die bij de huidige stand van de kankerchemotherapie de beste resultaten belooft, doordat zij de therapeutische breedte vergroot. De resultaten die de groep van Creech heeft behaald, zijn dan ook zeer bevredigend en aanzienlijk beter dan die, verkregen bij intraveneuse toediening. Toch is dit alles een begin en moet er verder gezocht worden naar stoffen met groter werkzaamheid, breder spectrum en grotere therapeutische breedte. Daarnaast moet het probleem van de verhoging van de algemene en specifieke weerstand onze volle aandacht hebben.

Verdere verbetering van de resultaten van de kankerchirurgie, wat betreft de kans op blijvende genezing die per patiënt wordt geboden, is nauwelijks te verwachten. Het is mogelijk, dat met behulp van kankerchemotherapeutica, indien deze gebruikt worden als adjuvans bij de kankerchirurgie, het overlevingspercentage opgevoerd kan worden. In het voorafgaande gedeelte van dit proefschrift is nagegaan, welke problemen en welke mogelijkheden dit vraagstuk biedt.

Het blijkt, dat de implantatiemetastasering op het peritoneum nog weinig bestudeerd is en dan nog voornamelijk bij de ascites-vormende tumoren, waar de celvermeerdering ook plaats vindt in het ascitesvocht zelf. Toch is deze metastasering voor de kankerchirurgie van het abdomen van groot belang, zodat wij ons hebben afgevraagd of het dierexperiment ons een beter inzicht kon geven omtrent de vraag of de prophylaxe van deze implantatie verbeterd kan worden met behulp van kankerchemotherapeutica. Het eerste deel van het nu volgende experimentele gedeelte geeft een verslag van de proeven en de daarbij verkregen resultaten.

EXPERIMENTEEL GEDEELTE

ONDERZOEK BETREFFENDE ENTMETASTASERING EN HAAR PROPHYLAXE

Proefopstelling

Bij de te beschrijven proefopstelling hebben wij ons ten doel gesteld na te gaan, of er kankerchemotherapeutica bestaan, die de overlevingstijd van intraperitoneaal met tumorcellen besmette dieren kunnen verlengen. Als proefdier was voor ons onderzoek de muis zeer geschikt, aangezien hiervan genetisch zuivere stammen bekend zijn, waarbij een bij de betreffende stam behorende tumor zeer gemakkelijk overentbaar is.

Er werd gebruik gemaakt van 7—10 weken oude, mannelijke zowel als vrouwelijke muizen van de stam C_{57} black, of de eerste bastaardgeneratie van ♀ $C_{57\ bl.}$ × ♂ O_{20} (aangeduid als F_1). Deze dieren waren ten dele afkomstig uit de stal van het Pathologisch-Anatomisch Laboratorium te Leiden en ten dele uit de eigen stal. Voorts werden nog een aantal $C_{57\ bl.}$ muizen betrokken van Organisatie T.N.O. te Rijswijk en van het Antoni van Leeuwenhoekhuis te Amsterdam.

Er valt hierbij op te merken, dat de dieren, afkomstig van Organisatie T.N.O., uit een ectromelia-vrije stal kwamen, terwijl onze stal niet als zodanig kon beschouwd worden. De ectromelie-vrije muizen waren ten dele tegen ectromelia gevaccineerd, ten dele niet. Tijdens de observatieperiode, die ongeveer 4 weken duurde, en waarbij de dieren normaal in de stal verbleven, werd in geen van beide groepen enige morbiditeit noch mortaliteit waargenomen. Er kon dus niet vastgesteld worden of de vaccinatie enig voordeel bood.

Alle muizen werden gehuisvest in standaardkooien van glas met afmetingen van 180 bij 120 mm en een hoogte van 130 mm. Het deksel was van verzinkt ijzer, voorzien van perforaties en een vierkante opening, waarin een voedselkorf van 60 bij 60 bij 60 mm geplaatst kon worden, vervaardigd van hetzelfde materiaal.

De dieren werden gevoed met laboratorium-rattenkorrels en tarwe ad libitum. Water werd toegediend door een wijdmonds poederflesje à 100 cc, dat voorzien was van een rubberstop, waardoor een smal glazen buisje was gestoken. Dit buisje werd door een gat in het deksel gebracht, waardoor het flesje op zijn kop kwam te staan en zich aan het eind van de buis constant een druppel vormde, zodat de dieren zonder onderbreking van schoon drinkwater konden worden voorzien. De temperatuur van de stal werd door middel van een thermostaat op ongeveer 24° C. gehouden; aan de vochtigheidsgraad werd geen bijzondere aandacht besteed.

Ten einde het gebeuren tijdens en na een intraperitoneaal verrichte

kankeroperatie bij de mens zoveel mogelijk te benaderen, werd gezocht naar een vaste tumor, die in een hoog percentage van de gevallen aanslaat, weinig neiging tot metastasering op afstand bezit, echter snel per continuitatem groeit. Bij een dergelijke tumor zou het beste de eventuele prophylactische werking van een kankerchemotherapeuticum op de implantatiemetastasering kunnen worden nagegaan. Bijkomstige en moeilijk meetbare factoren tengevolge van metastasering op afstand vertroebelen het beeld dan niet en kunnen buiten beschouwing worden gelaten.

Als experimentele tumor werd gebruikt een adeno-carcinoma mammae, aangeduid met het nummer 8013 b. Deze tumor werd ongeveer 11 jaren geleden geïnduceerd bij een ♀ $C_{57\ bl.}$ muis in het Antoni van Leeuwenhoekhuis, en is sedertdien subcutaan overgeënt bij dieren van deze stam. Verandering van eigenschappen werden hierbij niet waargenomen. De tumor groeit evengoed bij enting op mannelijke- als op vrouwelijke muizen, terwijl er ook geen verschil te bespeuren valt bij inoculatie van F_1's. De groei van het gezwel is zeer snel: in 14 dagen ontstaat, na subcutane inoculatie, een tumor van ongeveer 4 gram met afmetingen van ± 15 bij 20 bij 15 mm. De huid boven de tumor gaat dan ulcereren en spoedig hierna gaat het dier te gronde.

Ongeveer 2 weken na de enting wordt een tumordragend dier gedood door aetherdamp. Het gezwel wordt onder steriele voorzorgen verwijderd en in een weinig steriel physiologisch zout fijngeknipt, waarna 0,5 cc van deze grove suspensie bij een gezond ♀ dier onder de rughuid wordt ingebracht via een spuit met een dikke naald. In de te beschrijven experimenten is gebruik gemaakt van de op deze wijze verkregen passages nrs. 282 tot 315. De tumor heeft neiging invasief, maar niet versplinterend te groeien en kan gemakkelijk uitgepeld worden. Macroscopisch zijn er geen grote uitlopers waar te nemen. Op doorsnede is hij grauw-grijs van kleur, met weinig bloedvaten en veel necrose.

Microscopisch is het aspect van de tumor dat van een adenocarcinoma, groeiend in veldjes die door een geringe hoeveelheid stroma van elkaar worden gescheiden. Bij de wat grotere tumoren zijn er grote necrotische velden waar te nemen. In de omgeving hiervan vindt men cellig infiltraat. Het is opvallend, dat er langs de betrekkelijk gering in aantal zijnde bloedvaten kokertjes van levende cellen blijven bestaan, terwijl de cellen, die verder van de vaten zijn gelegen, afsterven. (Foto 1)

Het is duidelijk, dat bij de enting voor een zeer groot deel necrotisch materiaal wordt ingebracht, met een minderheid aan levende cellen. De verhouding is afhankelijk van de toestand van het donorgezwel.

Bij de secties van de dieren die voor de passage van de tumor gebruikt werden, is in het Pathologisch-Anatomisch Laboratorium te Leiden maar in een hoogst enkel geval haematogene metastasering waargenomen. Bij de in de beschreven proeven gebruikte dieren, is dit in het geheel niet het geval geweest.

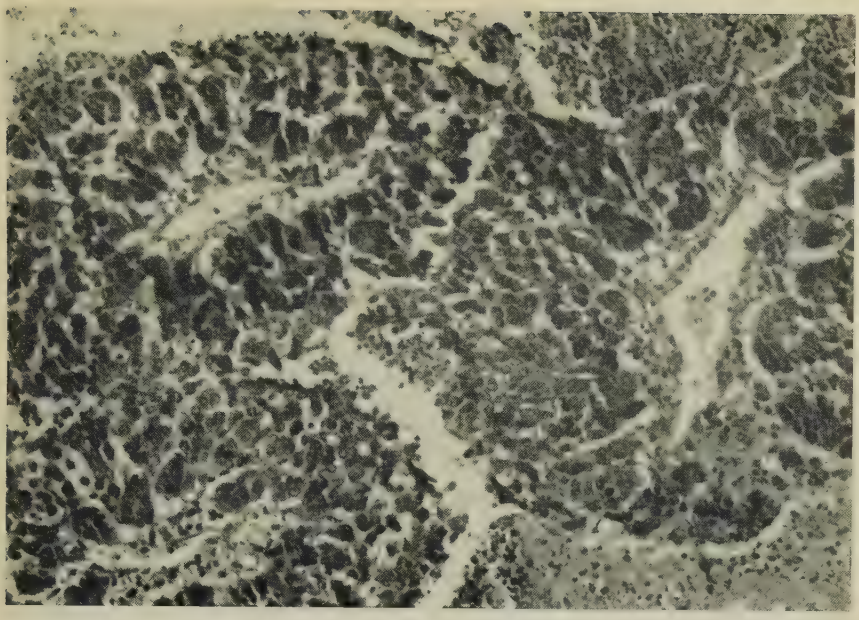


Foto 1

Experimentele mammatumor van de muis 140 × H.E.
Kokers van levende tumorcellen om de bloedvaten

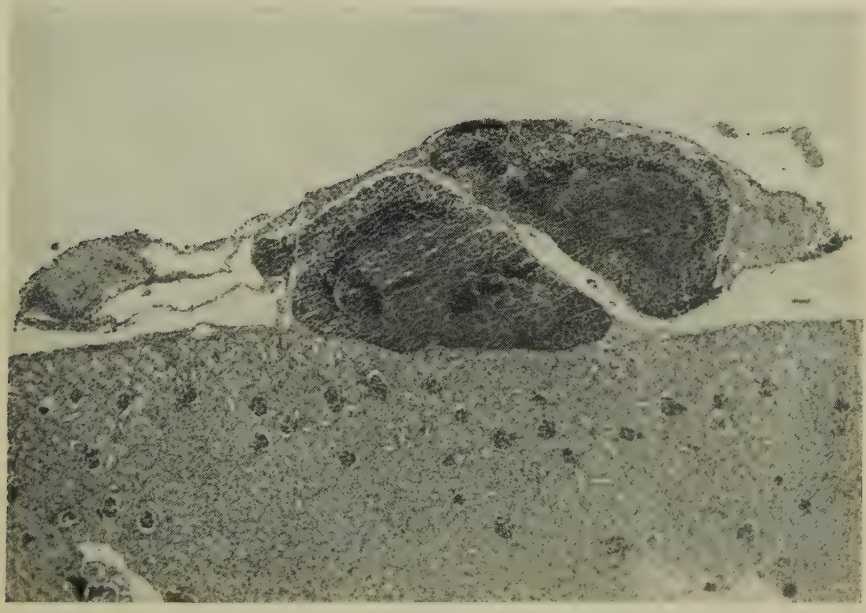


Foto 2

Implantatie-metastase op nierkapsel 44 × H.E.

Foto 3

Onbehandeld, spontaan overleden 10 dagen na inoculatie
Gedissemineerde tumorgroei met talrijke entmetastasen op het peritoneum

Foto 4

Met Melphalan behandeld, spontaan overleden 45 dagen na inoculatie
Slechts één gelocaliseerde tumormassa aanwezig

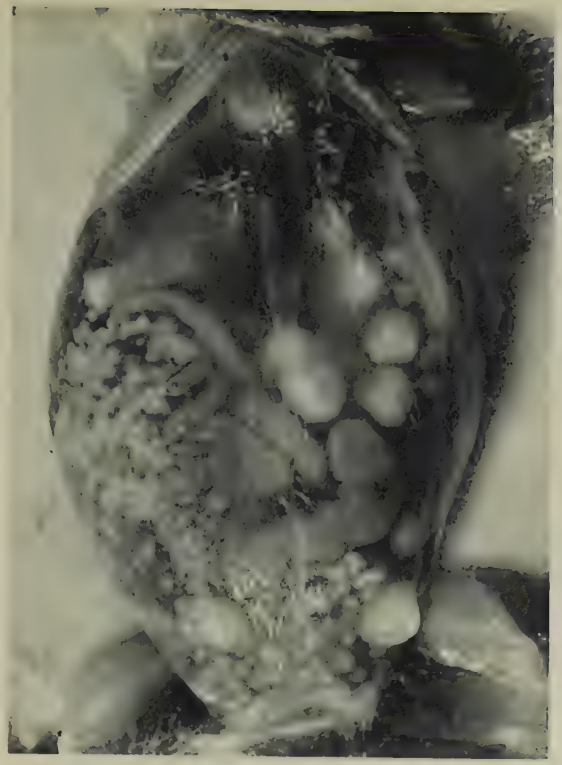


Foto 5

Onbehandeld, spontaan overleden 17 dagen na inoculatie

Op insteekplaatsen van het intacte peritoneum geprononceerde tumorgroei

Foto 6

Met Melphalan behandeld, afgemaakt 17 dagen na inoculatie

Geen zichtbare tumorgroei (vgl. foto 5)

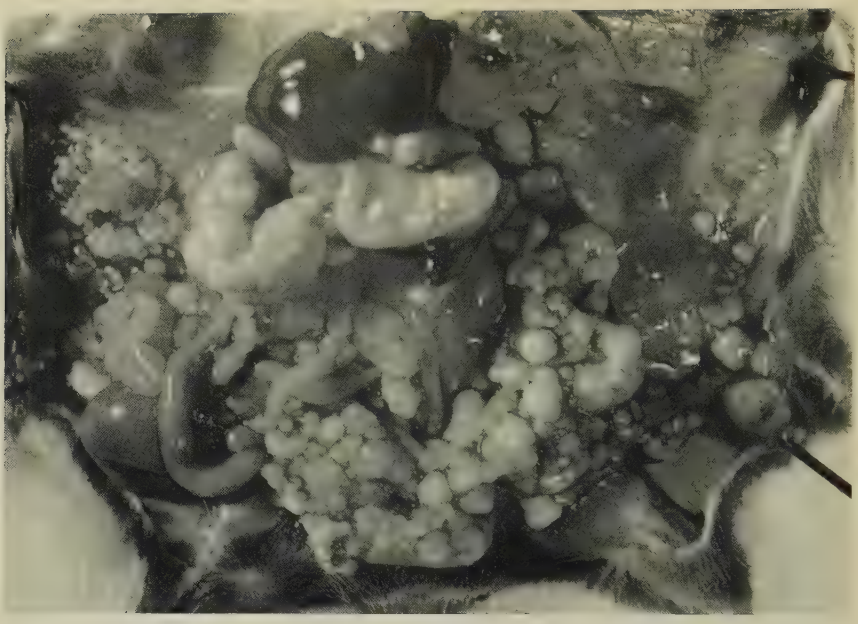


Foto 7

Onbehandeld, spontaan overleden 17 dagen na inoculatie
Peritoneum geopend: gedissemineerde tumorgroei

Foto 8

Met Melphalan behandeld, afgemaakt 17 dagen na inoculatie
Peritoneum geopend: gelocaliseerde tumorgroei op het peritoneum viscerale (vgl. foto 7)

Vooreerst werd nagegaan of het mogelijk was de genoemde tumor intraperitoneaal te doen groeien. Hiervoor werd een tumorsuspensie bereid op dezelfde wijze als bij een subcutane enting geschiedde, en van deze suspensie werd bij vijf ♀ $C_{57\,bl.}$ muizen met een dikke naald resp. $^1/_2$, $^1/_4$, $^1/_8$, $^1/_{16}$ en $^1/_{32}$ cc percutaan in de buikholte gebracht. Twee weken later werden de dieren gedood en bij de sectie bleken alle vijf een vrijwel even sterke tumorgroei intraperitoneaal te hebben. Bij histologisch onderzoek werd vastgesteld, dat de tumoren identiek waren met het geënte adenocarcinoma.

De groei was zeer verspreid; zowel op het parietale- als viscerale peritoneum waren tal van enkelvoudige knobbeltjes ontstaan met een doorsnede van hoogstens enige millimeters; soms waren er druiventros-achtige tumortjes gegroeid, opgebouwd uit tal van kleine gezwelletjes. (Foto 2, 3)

Vervolgens werd op dezelfde wijze de tumor geënt bij mannelijke $C_{57\,bl.}$ muizen en bij F_1's, met een even goed resultaat.

Het volgende punt was nu de tumorsuspensie die werd ingebracht, zodanig fijn te maken, dat er losse cellen en kleine celbrokjes zouden ontstaan om de omstandigheden bij kankeroperaties zoveel mogelijk te benaderen. Juist deze celbrokjes leken van groot belang te zijn, omdat het mogelijk is, dat deze gemakkelijker aanslaan en juist moeilijker voor een kankerchemotherapeuticum bereikbaar zouden zijn dan de geïsoleerde cel.

Zou de tumor behandeld worden met chymotrypsine, dan zou weliswaar een fraaie celsuspensie worden verkregen, maar geen brokjes tumor. Dit was de reden, dat de voorkeur werd gegeven aan een mechanische werkwijze.

Na verschillende middelen beproefd te hebben, bleek de volgende werkwijze het beste aan de gestelde eisen te beantwoorden: de tumor wordt afgewogen op een balans, waarbij voor steriliteit wordt zorg gedragen, en vervolgens fijngeknipt in een mortier, waarin wat steriel physiologisch zout is gebracht. Deze grove suspensie wordt nu gedurende 3 minuten fijngewreven en daarna gezeefd door 8 lagen nylongaas*), daarbij dóórgespoeld met physiologisch zout, tot per gram tumor een suspensie van 5 cc is verkregen. Deze is nu zó dun, dat zij gemakkelijk door een Luer Lock naald nr. B-D 21 kan worden gespoten. Om te zorgen, dat elk dier ongeveer evenveel vaste stof toegediend zou krijgen, werd vóór elke enting de suspensie goed gemengd; hierna werd percutaan intraperitoneaal 0.5 cc ingespoten. Bij elke proefneming werd van één suspensie gebruik gemaakt, zonodig bereid uit meerdere tumoren. Dit was noodzakelijk om te voorkomen, dat een groep dieren in één proefserie meer levende cellen zou toegediend krijgen dan een andere groep, aangezien elke donortumor in wisselende mate necrotisch is, de suspensie dus afhankelijk hiervan meer of minder levende cellen bevat. De verschillende proefseries zelf zijn

*) 51 gauge — 15 denier.

om dezelfde reden niet geheel vergelijkbaar; om de verschillen echter zo klein mogelijk te houden, werd er voor gezorgd, dat de donortumoren steeds ongeveer van dezelfde grootte waren.

Een aantal malen is in een tumorcelsuspensie, die op de genoemde wijze werd bereid en bewaard bij kamertemperatuur, het aantal levende cellen per mm^3 op diverse tijdstippen bepaald. Per cc suspensie werd 0.1 cc van een 2% eosine-oplossing in physiologisch zout toegevoegd; de levende cellen nemen de kleurstof niet op en zijn hierdoor te onderscheiden van dood materiaal. Door grootte en vorm is de kwaadaardige cel gemakkelijk te onderscheiden van andere levende cellen, bijv. leucocyten.

Alvorens te tellen in een telkamer volgens Bürker-Türk, op dezelfde wijze als leucocyten worden geteld, werd de suspensie 25 maal verdund.

De volgende uitkomsten werden hierbij verkregen:

Tijd verlopen na suspensiebereiding	Getelde aantal dode cellen	Getelde aantal levende cellen	Totaal	% levende cellen
½ uur	117	26	143	18
½ uur	140	36	176	20
1 uur	108	29	137	21
1 uur	97	31	128	24
1½ uur	159	31	190	18
1½ uur	103	33	136	24
Gemiddeld:	121	31	152	21

Het aantal ingebrachte levende cellen per dier zal globaal bedragen 4×10^7, berekend als volgt.

Het gemiddelde aantal getelde levende cellen per mm^3 bedraagt 100×31 cellen $= 3100$ cellen. Gebruik werd gemaakt van een 25-voudige verdunning, dus de suspensie bevat per mm^3 25×3100 levende cellen. Ingebracht wordt 500 mm^3 per dier, d.w.z. $500 \times 25 \times 3100$ levende cellen $= 3{,}875 \times 10^7$ cellen.

In een tijdsbestek van 1½ uur na de suspensie bereiding neemt het getelde aantal levende cellen niet af. Niet nagegaan is, hoe het beloop zou zijn geweest bij een verder voortschrijden van de tijd, aangezien bij de proeven nooit meer dan 1½ uur benodigd was om alle dieren te enten. Deze waarnemingen werden verricht bij kamertemperatuur; in het experiment werd de suspensie bovendien nog bewaard op ijs.

In de telkamer werden meestal losse cellen aangetroffen, maar geregeld kwamen ook tumorbrokjes voor van hoogstens 10 cellen. Zéér sporadisch werd een wat groter tumorbrokje gezien. De verdeling in de telkamer was redelijk homogeen, zowel wat levende losse cellen betrof als het vóórkomen van tumorbrokjes.

De volgende proef was een aanwijzing, dat er ook in vivo geen achteruitgang van de vitaliteit der tumorcelsuspensie te constateren viel, indien

deze werd bewaard bij 0°. Telkens drie $C_{57\ bl.}$ muizen werden na resp. 15-, 60- en 120 minuten intraperitoneaal geënt. Twee weken later vertoonden alle dieren tumorgroei, die niet correleerde met de tijd, gedurende welke de suspensie was bewaard. Ook bij de grotere experimenten bleek later, dat de laatst geënte dieren geen slechtere groei vertoonden dan de eerst geënte. Bij de sectie van deze dieren werd geen ascites waargenomen, evenmin werden haematogene metastasen gezien.

Enige voorwaarden voor het verrichten van de voorgestelde experimenten waren nu vervuld:

1. het is mogelijk met een vaste tumor, zo fijn verdeeld als overeenkomt met de tumorbrokjes die bij kankeroperaties achter kunnen blijven in het wondbed, intraperitoneaal fraaie implantatiemetastasen te verkrijgen, diffuus verdeeld over het gehele peritoneum.
2. de te gebruiken tumor heeft zeer weinig neiging tot haematogene uitzaaiing, des te meer tot groei per continuitatem. Er wordt hierbij weinig of geen vocht gevormd, wat een juiste beoordeling ten goede komt.
3. de tumor groeit in vrijwel 100% der gevallen bij zowel mannelijke als vrouwelijke muizen van de stam $C_{57\ bl.}$ of de eerste bastaardgeneratie ♀ $C_{57\ bl.}$ × ♂ O_{20}.

Aangezien bastaards in het algemeen een grotere weerstand hebben dan dieren van een genetisch zuivere stam, werden F_1's gebruikt voor die proeven, waarbij extra veel van het proefdier werd gevergd (operatieve ingrepen en coli-infecties).

Controle (C) en behandelde dieren (T) werden uit één serie gekozen met behulp van een tabel van aselecte getallen. Tevoren hadden de dieren een doorlopende nummering ontvangen. De keuze van controle- en behandelde dieren berustte dus geheel op toeval.

Proeven en proefresultaten

A. *Formaldehydespoeling*

In een kleine proefopstelling is getracht een indruk te krijgen omtrent een eventueel remmende invloed van formaldehyde 0.1% op intraperitoneale entmetastasering. Vier mannelijke en negen vrouwelijke bastaardmuizen (F_1's) werden ieder percutaan intraperitoneaal geënt met 0.5 cc tumorsuspensie. De enting geschiedde aan de linkerzijde van de buik. Een uur na de inoculatie werden de dieren genarcotiseerd met aetherdamp en werd, na scheren en wassen met alcohol 70%, de buikholte geopend d.m.v. een mediane snede van 1½ cm lengte. Vervolgens werd bij 6 dieren de buikholte via een stompe naald gedurende 3 minuten gespoeld met 10 cc steriel physiologisch zout; bij de overige muizen werd als spoel-

vloeistof gebruikt een steriele oplossing van formaldehyde 0.1% in physiologisch zout; overigens was de behandeling hier dezelfde. Na de spoeling werd het nog in de buikholte aanwezige vocht afgezogen en werd de buik in twee lagen gesloten (peritoneum met catgut, huid en spier met linnen). Hierna werden de dieren teruggebracht in hun kooi en dagelijks geobserveerd. Zodra een muis was overleden, werd sectie verricht en indien tumorweefsel aanwezig was, het totale tumorgewicht bepaald.

Het beloop was als volgt:

Overlevingstijd in dagen	Nr. en soort van het proefdier		Totale tumorgew. in gr.	Sectiebevindingen
11	C 1	♂	1.5	Op het gehele peritoneum parietale en -viscerale diffuse, kleinknobbelige tumorgroei. Ter hoogte van de entplaats een maiskorrelgrote tumor op het peritoneum parietale.
12	C 2	♂	1.8	Als C 1
15	C 3	♂	4.5	Als C 1, met zeer grote tumor ter hoogte van de entplaats.
17	C 4	♀	2.0	Als C 1
18	C 5	♀	2.4	Als C 1
18	C 6	♀	3.5	Als C 1
18	T 1	♀	1.5	Slechts ter hoogte van de entplaats één grote solitaire tumor op het peritoneum parietale. Overigens geen spoor van tumor.
21	T 2	♀	5.1	Grote tumor t.h.v. entplaats op peritoneum parietale, samenhangend met intracutaan en subcutaan gelegen tumormassa. Tevens een tumorknobbel achter de milt.
21	T 3	♀	6.2	Enorme tumor t.h.v. entplaats op peritoneum parietale, samenhangend met intracutaan en subcutaan gelegen tumormassa. Voorts enige verspreide tumortjes.
22	T 4	♀	4.0	Als T 2.
24	T 5	♀	4.5	Grote tumormassa t.h.v. entplaats op peritoneum parietale, gedeeltelijk subcutaan gelegen; verder enige tumortjes onder het diaphragma.
27	T 6	♀	7.1	Als T 5; echter ook een tumortje achter de milt.
33	T 7	♂	6.1	Als T 6.

C = Controle.
T = Behandeld.

De tumorgewichten, zowel bij deze proef als bij de nog te beschrijven experimenten, werden bepaald door alle macroscopisch zichtbaar tumorweefsel bij de sectie uit te prepareren en te wegen op een milligrambalans. Een absolute maatstaf is het niet, want het is onmogelijk inderdaad alle tumorweefsel te verwijderen; ook zal bij de excisie iets van de omgevende normale structuren worden meegenomen. Dit zal echter geen grote rol spelen, aangezien de tumor waarmee geëxperimenteerd werd, gemakkelijk

uit te prepareren is door zijn geringe infiltratieve groei. Het had evenwel geen zin om de gewichten tot op milligrammen nauwkeurig te bepalen; volstaan werd met een bepaling tot op tiende grammen nauwkeurig.

In deze proefserie is bij alle geënte dieren tumorgroei opgetreden. Bij de sectie van de muizen was zeer opvallend het grote verschil in groeipatroon tussen controle- en behandelde dieren. Bij de eersten was er een zeer sterk gedissemineerd tumorbeeld, waarbij het gehele peritoneum overdekt was met knobbeltjes, terwijl bij de met formaline behandelde dieren er een veel meer solitaire tumorgroei optrad, die zijn uitgangspunt voornamelijk leek te vinden ter hoogte van de plaats, waar de entnaald het peritoneum had doorboord. Bij de dieren uit de controlegroep trad op deze plaats ook steeds een geprononceerde tumorgroei op, maar toch veel minder het gehele beeld beheersend dan bij de behandelde muizen. Zuiver mediane gezwelgroei, die uit zou kunnen gaan van het laparotomie-litteken, werd bij geen enkel dier duidelijk waargenomen. Mogelijk, dat tijdens de lavage de hier aanwezige cellen weggespoeld zijn, terwijl ze op moeilijker te bereiken plaatsen, b.v. achter lever of milt, hieraan wisten te ontkomen. Want het blijkt wel duidelijk, dat een groot aantal cellen zijn ontsnapt aan de lavage met physiologisch zout, gezien de grote aantallen entmetastasen.

Anders is dat bij de met formaldehyde behandelde muizen: hoewel hier de ingestelde therapie evenmin afdoende is gebleken, is het aantal plaatsen waar tumorgroei is opgetreden veel geringer. Aangezien hun overlevingstijd echter aanmerkelijk langer was, hebben deze dieren in totaal méér tumormassa kunnen vormen.

B. *TSPA-toediening*

In een tweede proefserie werd de invloed van TSPA op intraperitoneaal geënte gezwellen nagegaan.

Voor deze proef werden 19 ♂ en 16 ♀ $C_{57\ bl.}$ muizen met 0.5 cc tumorsuspensie intraperitoneaal geënt. De inoculatie vond percutaan plaats aan de linker zijde van de buik.

Een uur na de inoculatie kreeg de helft van de proefdieren, via een dunne naald, rechts van de mediaanlijn 1 mg/kg lichaamsgewicht TSPA intraperitoneaal ingespoten. Het TSPA was opgelost in physiologisch zout, en de verdunning was zodanig gekozen, dat elk dier ongeveer 0.5 cc oplossing ontving. Door gebruik te maken van een Mantoux-spuit, kon de individuele dosis (die afhankelijk was van het gewicht van het proefdier, waardoor de hoeveelheid toegediende oplossing iets wisselde) nauwkeurig worden bepaald.

De twee hieropvolgende dagen werd van eenzelfde, vers bereide oplossing, telkens een hoeveelheid, overeenkomende met 0.5 mg/kg lichaamsgewicht TSPA op gelijke wijze en plaats toegediend, zodat in totaal 2.0 mg/kg lichaamsgewicht TSPA intraperitoneaal werd ingebracht. Dit ligt onder de maximaal getolereerde dosis bij de muis, is echter aanzienlijk

hoger dan de dosis, die bij de mens direct post-operatief wordt toegediend (0.8 mg/kg lichaamsgewicht). Met opzet is een dosering gekozen, die ongeveer het 2½-voudige van de bij de mens gebruikelijke dosis bedroeg. Mocht de stof effect sorteren, dan zou dit duidelijk tot uiting moeten komen. Het heeft echter weinig zin om een zeer hoge dosis toe te dienen die bij de mens nimmer gebruikt zou kunnen worden, aangezien dan een goede vergelijking van het effect van de stof op losse tumorcellen in een operatieterrein, en met name in de buikholte, niet mogelijk zou zijn.

De dieren die als controlegroep dienst deden, kregen i.p.v. een TSPA-oplossing, eenzelfde hoeveelheid physiologisch zout op gelijke wijze toegediend, eveneens 1 uur na de enting, na 24 uur en na 48 uur.

Het beloop van de proef is in de volgende tabel weergegeven:

Overlevingstijd in dagen	Nr. en soort van het proefdier		Totale tumorgew. in gr.	Sectiebevindingen
10	C 1	♂	0.3	Diffuus verspreide, speldeknopgrote entmetastasen op het peritoneum parietale en subdiaphragmaal.
10	C 2	♂	0.4	Als C 1; tevens ter hoogte van insteekplaats links een groter tumortje op het peritoneum parietale.
11	T 1	♂	1.5	Zeer diffuse tumorgroei op het gehele peritoneum parietale en -viscerale; ter hoogte van de insteekplaatsen links en rechts op het perit. parietale twee grotere tumoren.
12	T 2	♂	0.9	Als T 1.
12	T 3	♂	1.5	Diffuse tumorgroei, geprononceerd op het perit. parietale t.h.v. insteekplaats links.
12	T 4	♀	1.6	Als T 1.
12	T 5	♂	2.0	Als T 1.
13	C 3	♂	1.9	Als T 1; tumor links, uitgaande van het perit. parietale t.h.v. entingsplaats, is doorgegroeid tot in de huid.
13	C 4	♂	2.0	Als C 3.
13	C 5	♀	3.0	Als T 1; rechter tumor groter dan links.
13	C 6	♂	3.1	Zéér diffuse tumorgroei over het gehele peritoneum, vooral in de bovenbuik gelocaliseerd, met links op het perit. parietale t.h.v. insteekplaats een duidelijk gesepareerde, grotere tumor.
13	T 6	♂	2.0	Als T 3.
14	C 7	♀	2.0	Als T 3; tumor links op perit. parietale is zeer groot.
14	T 7	♀	4.1	Als C 7.
15	C 8	♀	2.1	Zeer diffuus verspreide tumorgroei over het gehele peritoneum; flinke tumoren op perit. parietale t.h.v. beide insteekplaatsen, vooral links.
15	T 8	♀	1.4	Als C 8; linker tumor vertoont doorgroei in de huid, met ulceratie.
15	T 9	♂	3.6	Als C 8.
15	T10	♀	4.3	Als C 8.

Overlevingstijd in dagen	Nr. en soort van het proefdier		Totale tumorgew. in gr.	Sectiebevindingen
16	C 9	♂	3.5	Diffuus verspreide tumorgroei, met grote bolronde tumor op perit. parietale links t.h.v. insteekplaats.
16	C10	♀	5.5	Diffuse tumorgroei in de buikholte, met zeer grote tumor op het perit. parietale links en een grote tumormassa in het kleine bekken.
16	T11	♂	3.7	Zeer diffuse tumorgroei met grote tumor op perit. parietale links, t.h.v. insteekplaats, en kleiner tumortje rechts. Op de leverrand enige entmetastasen.
16	T12	♀	4.0	Als T 3.
16	T13	♀	4.3	Als C 8.
17	T14	♀	4.3	Diffuus verspreide tumorgroei; de tumor uitgaande van het perit. parietale links t.h.v. entingsplaats, is doorgegroeid tot in de huid. Gelijksoortige tumor rechts eveneens, maar deze is iets kleiner.
17	T15	♂♀	5.5	Als T 14 maar meer geprononceerd.
18	C11	♂♀	4.0	Als T 14; tumor links ulcereert.
18	T16	♂♀	3.5	Als T 14.
18	T17	♂♀	4.4	Als T 14.
19	C12	♀	6.3	Als C 11.
19	C13	♀	4.0	Diffuus verspreide tumorgroei over gehele peritoneum. T.h.v. insteekplaats links op het perit. parietale grote tumor, doorgegroeid tot in de huid. Rechts twee kleinere tumortjes, niet doorgegroeid, duidelijk afgegrensd van de overige tumorknobbeltjes.
20	C14	♀	5.1	Als C 13.
21	C15	♂	4.4	Als C 13.
23	C16	♂	3.7	Als C 13.
24	C17	♂	7.5	Enorme tumormassa in de buikholte, waarin opgenomen milt, linker nier en een gedeelte van dunne- en dikke darm. Hiernaast vele gesepareerde tumorknobbeltjes. T.h.v. insteekplaats links op perit. parietale staat de tumormassa in verbinding met een intra- en subcutaan gelegen tumor die ulceratie vertoont. Op perit. parietale rechts, t.h.v. insteekplaats twee goed afgegrensde tumortjes.

C = Controle.
T = Behandeld.

Bij alle dieren, zowel de behandelde als de onbehandelde, viel de zeer diffuus verspreide, knobbelige tumorgroei op, met als voorkeursplaats het peritoneum parietale ongeveer ter hoogte van de plaatsen waar dit was doorboord, hetzij bij de inoculatie van tumorcellen (links) hetzij bij de toediening van het chemotherapeuticum c.q. placebo (rechts).

In het algemeen was de tumorgroei ter hoogte van de linker insteekplaats het sterkst; hier was bovendien steeds een min of meer grote tumor aanwezig, behalve bij het eerste controledier. In vele gevallen was de

steekplaats eveneens uitgangspunt van verdere doorgroei van het gezwel in de buikwand (al of niet gepaard gaande met ulceratie) voorzover hier van doorgroei sprake is en niet van locale tumorgroei in het steekkanaal.

Bij één dier (C18) trad geen tumorgroei op. Na tien weken werd het dier opgeofferd: er werd geen tumorgroei aangetoond.

Macroscopisch was er geen enkel verschil te zien in groeipatroon tussen de beide groepen.

Steekproefgewijs werd de tumor en een aantal organen van drie met TSPA behandelde dieren histologisch onderzocht en vergeleken met gelijksoortige coupes van controledieren. De onderzochte organen waren achtereenvolgens:

lympheklier	long
nier	dunne darm
milt	dikke darm
lever	

In geen enkel geval werd enig verschil tussen niet- en wel met TSPA behandelde dieren waargenomen.

Ook bij diverse enzymkleuringen, die op een tumor van een behandeld dier werden toegepast, bleek er geen verschil te bestaan met de tumor van een niet behandelde muis.

Bij geen enkel dier werden haematogene- of lymphogene metastasen gezien.

Uit de gevonden waarnemingen kan geconcludeerd worden, dat macroscopisch noch microscopisch enig verschil tussen beide groepen aanwezig is; het TSPA heeft geen zichtbare veranderingen tengevolge gehad in de tumor en in de onderzochte organen, noch in het groeipatroon van het gezwel.

C. *Melphalantoediening*

Bij een derde proefopstelling werd als chemotherapeuticum Melphalan = p-[bis(β chloroaethyl)-amino]-l-phenyl-alanine gebruikt.

Veertig ♂ $C_{57\ bl.}$ muizen werden alle intraperitoneaal geënt met 0.5 cc tumorsuspensie, percutaan, via de linker buikwand. Eén uur na de enting kreeg de helft van de dieren 4 mg/kg lichaamsgewicht Melphalan intraperitoneaal toegediend, eveneens percutaan, maar nu via de rechter buikwand. Op dezelfde wijze kregen de controledieren alleen het oplosmiddel ingespoten.

Ook hier werd de verdunning weer zodanig gekozen, dat bij elk dier ongeveer 0.5 cc van de oplossing met een Mantoux-spuit werd ingebracht. De toediening vond slechts eenmaal plaats.

Het Melphalan is het linksdraaiende phenyl-alanine-mosterd, en werd ons ter beschikking gesteld door Burroughs Wellcome & Co. (USA) Inc.

Aangezien de stof in oplossing moeilijk houdbaar is, werd deze in de

Apotheek van het Academisch Ziekenhuis te Leiden kort voor het gebruik bereid.

Sterilisatie van het kristallijne poeder is niet mogelijk maar ook niet nodig, omdat Melphalan, evenals de andere mosterdpreparaten, zich zelf steriliseert. Het oplossen is echter een groot probleem; om een heldere oplossing te verkrijgen werd het volgende procédé toegepast:

1. 25 mg Melphalan wordt afgewogen in een steriele ampul.
2. Hieraan wordt toegevoegd 0.5 cc steriele aethyl-alcohol, die 2% w/v HCl bevat (4.7 cc HCl 36%; hierbij steriele alcohol 96% tot 100 cc). Na schudden lost de stof ogenblikkelijk op.
3. Vervolgens wordt toegevoegd 4.5 cc van een steriele oplossing, bestaande uit:

   $K_2 PO_4$ 2% w/v
   Propyleen glycol 45% v/v
   H_2O ad 100 volumepercenten.

Nu is een oplossing bereid met een pH van $\pm$ 7, die gedurende enige tijd helder blijft en zonodig met physiologisch zout gemakkelijk verder te verdunnen is.

Zonder bezwaar kan de oplossing intraveneus of locaal worden ingespoten, ook bij patiënten. Aangeraden wordt de oplossing binnen 30 minuten na de bereiding te gebruiken.

De dosering van 4 mg/kg lichaamsgewicht werd gekozen op dezelfde gronden als de TSPA dosis: ongeveer het $2\frac{1}{2}$-voudige van de in de kliniek gebruikelijke. Ook hier blijft de dosering onder de maximaal door het proefdier getolereerde dosis.

Evenals in beide vorige proefopstellingen werd ook hier de overlevingstijd bepaald, en sectie verricht zodra het dier gestorven was, waarbij tevens het totale tumorgewicht werd vastgesteld.

Het resultaat van deze proef was als volgt:

Overlevingstijd in dagen	Nr. en soort van het proefdier	Totale tumorgew. in gr.	Sectiebevindingen
9	C 1	2.0	Zeer diffuus verspreide tumorgroei over het perit. parietale en -viscerale. Op het perit. parietale links ter hoogte van de entingsplaats is een groter tumorknobbeltje aanwezig.
10	C 2	1.2	Als C 1.
10	C 3	1.2	Als C 1, echter op het perit. parietale links is geen duidelijk grotere tumor aanwezig.
10	C 4	1.6	Als C 1.
10	C 5	2.6	Als C 1.
10	C 6	2.8	Diffuus verspreide tumorgroei over het gehele peritoneum, met links ter hoogte van de insteekopening op het perit. parietale een grotere tumorknobbel en rechts een gesepareerd speldeknopgroot tumortje.

Overlevingstijd in dagen	Nr. en soort van het proefdier	Totale tumorgew. in gr.	Sectiebevindingen
10	C 7	2.9	Als C 1.
10	C 8	3.0	Als C 1.
11	C 9	1.8	Als C 1.
11	C10	2.5	Als C 1.
11	C11	2.9	Tumorgroei diffuus verspreid over het gehele peritoneum, met meer massale groei onder de lever en achter de milt. Op het peritoneum parietale links, t.h.v. de insteekplaats een iets grotere tumor.
12	C12	2.4	Als C 11, maar ook ter hoogte van rechter insteekplaats een geprononceerd tumortje.
12	C13	2.8	Als C 11.
12	C14	3.0	Diffuus over het gehele peritoneum verspreide, speldeknopgrote tumortjes.
12	C15	3.0	Als C 11.
13	C16	2.4	Over het gehele peritoneum verspreide tumorgroei, vooral in de bovenbuik. Links t.h.v. insteekplaats door het perit. parietale, een grotere tumor, die doorgroei vertoont tot in de huid.
15	C17	4.2	Als C 16.
16	C18	3.8	Vooral mesenteriale tumorgroei. Tevens t.h.v. linker insteekplaats door het perit. parietale een grotere tumor.
17	C19	4.3	Als C 18, tevens subdiaphragmaal sterke tumorgroei.
20	T 1	1.8	Links, ter hoogte van de insteekplaats een ronde, knikkergrote tumor, intra- en subcutaan gelegen, die met een dun strengetje samenhangt met het perit. parietale. Intraperitoneaal een circumscript tumortje op het perit. parietale, t.h.v. de insteekplaats links. Speldeknopgrote tumortjes achter milt en maag. Overige peritoneum geheel vrij van tumorgroei.
22	T 2	1.7	Vrijwel hetzelfde beeld als T 1, met een knikkergrote, subcutaan gelegen tumor, t.h.v. de insteekplaats links, die samenhangt met het peritoneum parietale. Intraperitoneaal is een groter tumorknobbeltje aanwezig op het perit. parietale, t.h.v. insteekplaats links, en een zeer klein tumortje respectievelijk sub-diaphragmaal en achter de milt. Het peritoneum is verder glad.
25	T 3	4.4	Hazelnootgrote tumor links, intra- en subcutaan gelegen, met beginnende ulceratie, die samenhangt met het perit. parietale, en overgaat in een grote tumormassa in het linker onderkwadrant van de buikholte. Voorts in de bovenbuik enige tumortjes met een doorsnede van 1—2 mm. Het overige peritoneum is vrij van zichtbare tumorgroei.

Overlevingstijd in dagen	Nr. en soort van het proefdier	Totale tumorgew. in gr.	Sectiebevindingen
25	T 4	7.4	Hazelnootgrote tumor t.h.v. insteekplaats links, gelegen in huid en subcutis, samenhangend met een zeer uitgebreide tumormassa in het linker onderkwadrant van de buikholte. Overigens geen entmetastasen op het peritoneum te zien.
26	T 5	4.3	Walnootgrote, intra- en subcutaan gelegen tumor links, met beginnende ulceratie, samenhangend met een grote intra-peritoneale tumormassa links. Verder wordt op het mesenterium en subdiaphragmaal een klein tumortje gezien.
28	C20	4.1	Zeer diffuus verspreide tumorgroei over het gehele peritoneum, met op het perit. parietale t.h.v. de insteekplaatsen een grotere tumor, waarvan de linker is doorgegroeid in subcutis en huid; deze ulcereert.
29	T 6	4.5	Walnootgrote, subcutaan gelegen tumor links ter hoogte van de insteekplaats, die in verbinding staat met een enorme tumormassa links in de buik. Rechts op het perit. parietale, ter hoogte van de insteekplaats, wordt een klein tumorknobbeltje gezien, en een iets groter knobbeltje subdiaphragmaal.
35	T 7	1.9	Rechts een subcutaan en intracutaan gelegen hazelnootgrote tumor, t.h.v. insteekplaats, met beginnende ulceratie. Intraperitoneaal een speldeknopgroot tumortje in de leverhilus; overigens geen tumorgroei.
35	T 8	7.2	Links ter hoogte van de entplaats een hazelnootgrote, subcutaan en intracutaan gelegen ulcererende tumor, die samenhangt met een enorme tumormassa in de buik. Ook rechts subcutaan een tumortje, samenhangend met een klein gezwel op het perit. parietale t.h.v. de insteekplaats. Subdiaphragmaal enige tumortjes met doorsnede van ongeveer 2 mm.
38	T 9	8.1	Links intra- en subcutaan gelegen tumor, ulcererend, die verbonden is met een zeer grote intraperitoneaal gelegen tumor (6.6 gr). Voorts op het peritoneum parietale enige speldeknopgrote tumortjes.
38	T10	9.2	Als T 9. De intraperitoneale tumormassa weegt hier zelfs 8.8 gr.
40	T11	10.2	Zeer grote intra- en subcutaan gelegen, ulcererende tumor links, in verbinding staand met grote tumorknobbel intraperitoneaal. Overigens geen tumorgroei waargenomen.
41	T12	7.0	Als T 11.
41	T13	9.3	Walnootgrote, intra- en subcutaan gelegen tumor links, ulcererend, die in verbinding staat met een het gehele kleine bekken opvullende tumormassa. Voorts achter de milt een klein tumortje.

Overlevingstijd in dagen	Nr. en soort van het proefdier	Totale tumorgew. in gr.	Sectiebevindingen
41	T14	9.7	Als T 13.
42	T15	7.1	Walnootgrote, ulcererende, intra- en subcutaan gelegen tumor links. Er is geen duidelijke verbinding met de buikholte. Onder de milt een tumortje van 200 mg; overigens intra-peritoneaal geen enkel teken van tumorgroei.
43	T16	10.0	Walnootgrote, subcutaan en intracutaan gelegen tumor links, die nog niet ulcereert, in verbinding staand met een zeer grote tumor in de buikholte. Overigens geen enkel teken van tumorgroei.
48	T17	9.4	Als T 16.
48	T18	12.7	Als T 16.
51	T19	3.9	Slechts t.h.v. insteekplaats links een kleine, subcutaan gelegen tumor met doorsnede van ongeveer 3 mm, in verbinding staand met intraperitoneale tumorgroei. Deze laatste is van diffuus karakter, met ingroei in de lever.
51	T20	5.9	Als T 16.

C = Controle.
T = Behandeld.

Geen van de dieren bleek bij de sectie haematogene of lymphogene metastasen te hebben, hoewel alle muizen uit deze proefserie een duidelijke tumorgroei vertoonden.

Een verschil in groeipatroon tussen de beide groepen komt hier duidelijk tot uiting. De controlegroep heeft een gedissemineerde groei op het peritoneum, waarbij ter hoogte van de punctieplaatsen van entmateriaal en placebo, steeds geprononceerde tumorgroei optreedt. Hierbij overheerst de groei links, ter hoogte van de plaats, waar de naald met entmateriaal het peritoneum parietale heeft doorboord. (Foto 5, 7)

De therapiegroep heeft een veel meer circumscripte, echter meer massale tumorgroei, die onveranderlijk ter hoogte van de linker insteekplaats (entmateriaal) gezeteld is, behalve in slechts één geval: T 7. (Foto 4, 6, 8) Hiernaast zijn in de buikholte enkele plaatsen van geringe tumorgroei te vinden en soms ontbreken ook deze nog.

Het gehele tumorgroeipatroon van de met Melphalan behandelde dieren gelijkt morphologisch zeer sterk op de met formaldehyde 0.1% behandelde dieren.

Een identiek experiment werd uitgevoerd met 28 ♀ $C_{57\ bl.}$ muizen.
Afgezien van het verschil in sexe, waren de muizen ook iets jonger dan

die van de eerste proef met Melphalan, overigens waren alle proefomstandigheden dezelfde. Nu werden de volgende resultaten verkregen:

Overlevingstijd in dagen	Nr. en soort van het proefdier	Totale tumorgew. in gr.	Sectiebevindingen
10	C 1	1.7	Zeer diffuus verspreide intraperitoneale tumorgroei. Ter hoogte van beide insteekplaatsen op het peritoneum parietale een wat groter tumortje.
10	C 2	2.8	Als C 1; het linker tumortje is doorgegroeid in de spierlaag die het perit. parietale bedekt.
10	C 3	3.9	Als C 2.
11	C 4	1.8	Zeer diffuus verspreide tumorgroei intraperitoneaal. Tegen achterste peritoneum is wat necrotisch materiaal gelegen: mogelijk is bij de enting de darm aangeprikt met als gevolg een locale peritonitis met abscesvorming.
12	C 5	2.8	Als C 1.
14	C 6	4.2	Als C 1.
15	C 7	4.3	Als C 2.
15	C 8	4.7	Zeer diffuus verspreide entmetastasering over het gehele peritoneum; op het perit. parietale is confluering opgetreden, met plaquevorming.
16	C 9	4.0	Als C 8, tevens links en in mindere mate rechts t.h.v. insteekplaatsen, een door de het peritoneum bedekkende spierlaag heengegroeide tumor, die links een doorsnede heeft van ongeveer 2 mm.
16	C10	4.9	Eveneens diffuus verspreide tumorgroei, maar voornamelijk op het peritoneum viscerale. Op het perit. parietale alleen ter hoogte van beide insteekplaatsen een duidelijke tumor.
17	C11	5.9	Als C 2.
17	C12	6.5	Diffuus verspreide tumorgroei, met twee geprononceerde tumortjes op het perit. parietale t.h.v. insteekplaatsen. Links doorgegroeid tot in de huid, met begin van ulceratie.
17	T 1	2.2	Zeer gelocaliseerde tumormassa links onder in de buikholte gelegen, die ten dele de nier insluit. Verder een enkel subdiaphragmaal gelegen gezwelletje.
18	T 2	1.3	Geïsoleerde tumor links in de onderbuik gelegen, uitgaande van het perit. parietale t.h.v. de entplaats en doorgroeiend in de spierlaag die het peritoneum bedekt. Voorts vijf kleine tumorknobbeltjes op het perit. parietale en enige subdiaphragmaal gelegen knobbeltjes.
20	C13	4.3	Zeer diffuus verspreide tumorgroei op het gehele peritoneum. Ter hoogte van beide insteekplaatsen doorgroei, links sterker dan rechts.
21	T 3	1.4	Intraperitoneaal alleen een tumortje onder het diaphragma en één achter de milt. Voorts grotere tumor op het perit. parietale, ter hoogte van de insteekplaats links, die doorgegroeid is tot in de subcutis.

Overlevingstijd in dagen	Nr. en soort van het proefdier	Totale tumorgew. in gr.	Sectiebevindingen
21	T 4	1.6	Enige kleine tumortjes subdiaphragmaal en een tumortje op het mesenterium. Links subcutaan een gezwel met doorsnede van ongeveer 3 mm. Verder geen groei.
26	T 5	2.9	In de buikholte geringe, gedissemineerde tumorgroei. Grotere tumor t.h.v. insteekplaats links door het perit. parietale, die niet duidelijk in verbinding staat met een subcutaan gelegen tumor op dezelfde hoogte.
28	T 6	3.5	Grote compacte tumormassa in de buikholte links onder, doorgaand tot in de subcutis en huid. Ook subdiaphragmaal enige kleine tumortjes.
33	T 7	6.6	Intraperitoneaal twee grote tumormassa's: één in de bovenbuik tegen de onderzijde v.h. diaphragma gelegen en één links in de onderbuik, die in verbinding staat met een hazelnootgrote sub- en intracutaan gelegen tumor. Overigens geen tekenen van tumorgroei.
37	T 8	4.0	Walnootgrote, ulcererende tumor links aan de onderbuik, overgaande in een grote, solitaire tumormassa links in de buikholte gelegen. Verder subdiaphragmaal tumorgroei en op de milt twee entmetastasen.
42	T 9	8.1	Walnootgrote, niet ulcererende tumor, intra- en subcutaan gelegen aan de linkerzijde van de onderbuik, overgaande in een grote solitaire intraperitoneale tumor. Ook enige kleine mesenteriale tumorknobbeltjes en een zeer groot gezwel subdiaphragmaal.
42	T10	9.0	Als T 9; subdiaphragmaal echter minder tumorgroei. De lever is vergroot.
47	T11	4.1	Op het perit. viscerale tamelijk verspreide (diffuse) tumorgroei; subdiaphragmaal een massief gezwel. Het perit. parietale is vrij van tumor. Geen tumor buiten de buikholte.
50	T12	6.3	Walnootgrote, links intra- en subcutaan gelegen ulcererende tumor, die overgaat in een evengroot gezwel links in de buikholte. Overigens geen gezwelgroei gezien.
52	T13	4.8	Intraperitoneaal een grote tumor subdiaphragmaal, die de organen naar beneden heeft gedrongen en de lever ten dele omgroeid. Verder geen spoor van tumorgroei.

C = Controle.
T = Behandeld.

Eén behandeld dier stierf op de 14e dag na de enting; er werd geen tumorgroei vastgesteld, echter was er een groot absces in de buik aanwezig, waarschijnlijk ontstaan ten gevolge van een perforatie van de darm. Deze muis werd niet in de serie opgenomen, evenals een behandeld dier,

dat na 70 dagen werd opgeofferd en waarbij bij de sectie geen tumorgroei werd waargenomen.

Het macroscopisch waargenomen tumorbeeld stemt geheel overeen met dat van de vorige proef. Hier gelden dan ook dezelfde overwegingen als aldaar zijn uiteengezet.

Van vijf aselect gekozen dieren uit de met Melphalan behandelde muizen, werd histologisch onderzoek verricht van de tumor en van de organen, reeds genoemd bij het TSPA-experiment. Hetzelfde vond plaats met vijf controle-muizen. Verschillen konden niet vastgesteld worden, met name waren er geen degeneratieve afwijkingen te zien aan nier, darm, milt en lever. Ook het microscopisch beeld van de tumor stemde in beide groepen nauwkeurig overeen. Herhaaldelijk werden entmetastasen op het kapsel van milt, nier of lever vastgesteld en eenmaal werd ingroei in de lever waargenomen, met compressie van het omgevende leverweefsel. Haematogene of lymphogene metastasen werden niet gezien. In één geval werd op de pleura enige tumorgroei gezien, waarschijnlijk ten gevolge van doorgroei vanuit het abdomen; dit is de enige maal dat intrathoracaal tumorgroei werd aangetoond.

Bij één behandeld dier werd in één leverkwab een vooral centraal gelegen, haardvormige necrose waargenomen; de haardjes wisselden in grootte en breidden zich soms uit tot bijna een geheel lobje. In de overige leverkwabben van dit dier werd niets afwijkends gezien. Ten einde na te gaan of hier een Melphalan-effect in het spel was, werd bij 6 gezonde $C_{57\ bl.}$ muizen intraperitoneaal 4 mg/kg lichaamsgewicht Melphalan ingespoten, op dezelfde wijze opgelost als bij de beschreven experimenten.

Na respectievelijk 1, 2, 3 en 5 weken werden resp. 1, 2, 2 en 1 dier opgeofferd en werden van lever en nier H.E. coupes gemaakt; bovendien werden deze organen histochemisch onderzocht. In geen enkel geval werd een afwijking gevonden, zodat mag worden aangenomen, dat deze gelocaliseerde levernecrose bij dit ene dier niet toegeschreven moet worden aan het phenyl-alanine-mosterd.

Van 4 met Melphalan behandelde dieren vond een onderzoek plaats naar de enzym-activiteit van tumor, lympheklier, milt, lever, dikke- en dunne darm. Hetzelfde geschiedde bij een viertal controledieren.

Nagegaan werden de volgende enzym-activiteiten:

1. *Alcalische phosphatase.*

   De tumor reageert zwak positief. De levers van muizen met tumor hebben een hogere alcalische phosphatase activiteit bij de sinus, dan die van dieren zonder tumoren.

2. *Zure phosphatase.*

   De macrophagen vertonen een sterke activiteit; het tumorweefsel zelf reageert slechts zwak positief.

3. *Amino-peptidase.*
   De tumor reageert negatief.
4. *Adenosine-tri-phosphatase.*
   De tumor reageert matig positief.
5. *Esterase.*
   Alleen zwak positieve reactie in de necrosehaarden van de tumor. De levende cellen reageren negatief.
6. *5-Nucleo-peptidase.*
   Alleen enige activiteit in de vaatwanden.
7. *Barnsteenzuur-dehydrogenase.*
   Vrijwel geen activiteit in de tumor.
8. *Melkzuur-dehydrogenase.*
   De tumor reageert fraai positief.
9. *Isocitroenzuur-dehydrogenase.*
   De tumor vertoont vrijwel geen activiteit.
10. *Glucose-6-phosphaat-dehydrogenase.*
    De tumor reageert negatief.

Verschillen tussen behandelde- en niet-behandelde dieren werden niet waargenomen.

Op grond van histologisch en histochemisch onderzoek kon geen verschil aangetoond worden tussen tumoren en organen van wel- en niet behandelde dieren. Het is onwaarschijnlijk, dat het Melphalan in de gebruikte dosering blijvende degeneratieve veranderingen heeft veroorzaakt van de onderzochte organen. Evenmin is het waarschijnlijk, dat deze stof de tumor zelf in zijn wezen heeft veranderd.

De waarnemingen, betreffende overlevingstijden en de daarbij behorende tumorgewichten zullen nu overzichtelijk worden weergegeven, zodat zij zich beter lenen tot het trekken van enige conclusies.

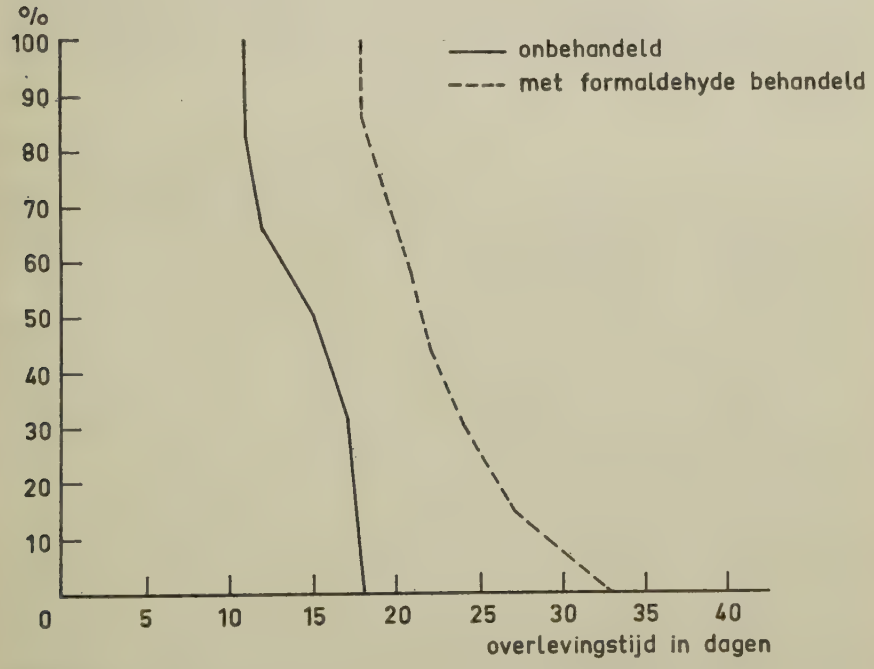
A. *Overlevingstijden*

OVERLEVINGSTIJDEN BIJ PROEF A

	Gespoeld met physiologisch zout		Gespoeld met formaldehyde 0,1%	
	Aantal dieren	Overlevingstijd in dagen	Aantal dieren	Overlevingstijd in dagen
	1	11	1	18
	1	12	2	21
	1	15	1	22
	1	17	1	24
	2	18	1	27
			1	33
Totaal	6	91	7	166
Gemiddeld		15,1		23,7

Getoetst met de 2-steekproeventoets van Wilcoxon blijkt de behandelde groep significant langere overlevingstijden te hebben (P = 0,001 *).

De vertraagde sterfte in de therapiegroep komt duidelijk tot uiting in figuur 1.



figuur 1

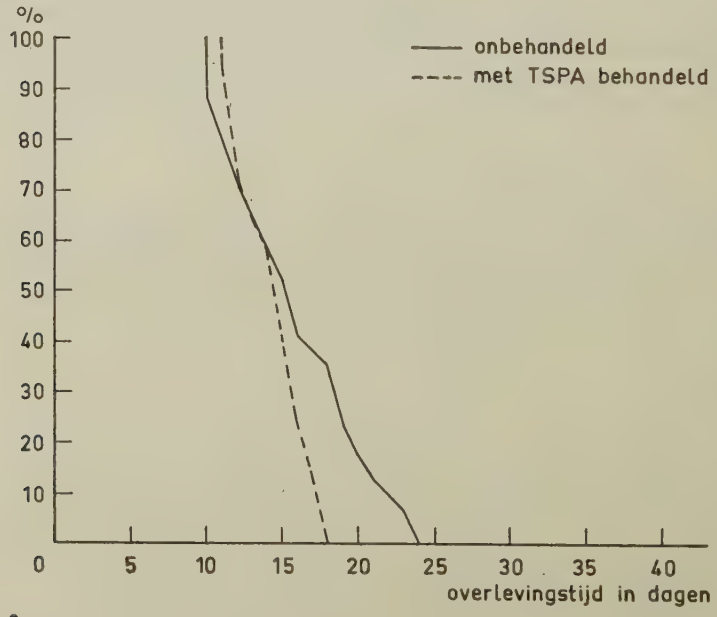
*) Alle vermelde overschrijdingskansen (symbool P) zijn éénzijdig.

OVERLEVINGSTIJDEN BIJ PROEF B

	Onbehandeld		TSPA 2,0 mg/kg l.g.	
	Aantal dieren	Overlevingstijd in dagen	Aantal dieren	Overlevingstijd in dagen
	2	10	1	11
	4	13	4	12
	1	14	1	13
	1	15	1	14
	2	16	3	15
	1	18	3	16
	2	19	2	17
	1	20	2	18
	1	21		
	1	23		
	1	24		
Totaal	17	277	17	239
Gemiddeld		16,2		14,0

Getoetst met de 2-steekproeventoets van Wilcoxon, blijkt er geen significant verschil te bestaan tussen beide groepen (P = 0,125). Zie figuur2.

Er werd geen significant verschil tussen de overlevingstijden van ♂ en ♀ controledieren gevonden (P = 0,27); evenmin was dit het geval bij ♂ en ♀ met TSPA behandelde muizen (P = 0,084).

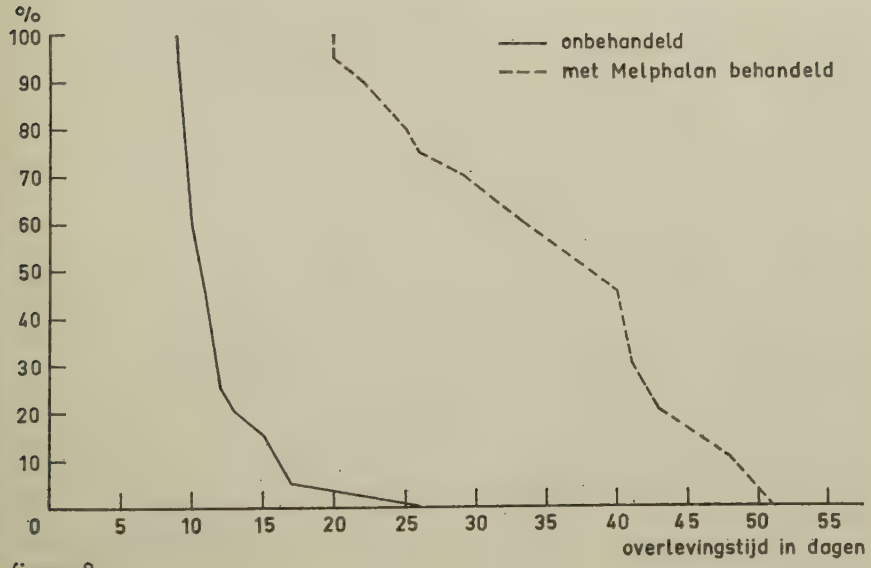


figuur 2

OVERLEVINGSTIJDEN BIJ PROEF C1

	Onbehandeld		Melphalan 4,0 mg/kg l.g.	
	Aantal dieren	Overlevingstijd in dagen	Aantal dieren	Overlevingstijd in dagen
	1	9	1	20
	7	10	1	22
	3	11	2	25
	4	12	1	26
	1	13	1	29
	1	15	2	35
	1	16	2	38
	1	17	1	40
	1	28	3	41
			1	42
			1	43
			2	48
			2	51
Totaal	20	249	20	739
Gemiddeld		12,4		36,9

Statistisch is hier een zeer significant verschil aanwezig tussen de beide groepen: getoetst met de 2-steekproeventoets van Wilcoxon is de overschrijdingskans $P < 0{,}0001$. Figuur 3 geeft de afsterving in beide groepen grafisch weer.

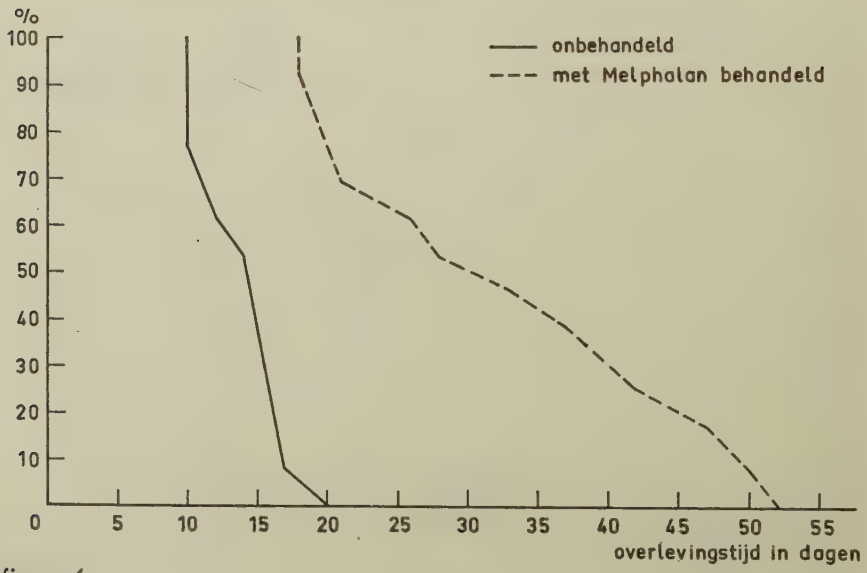


figuur 3

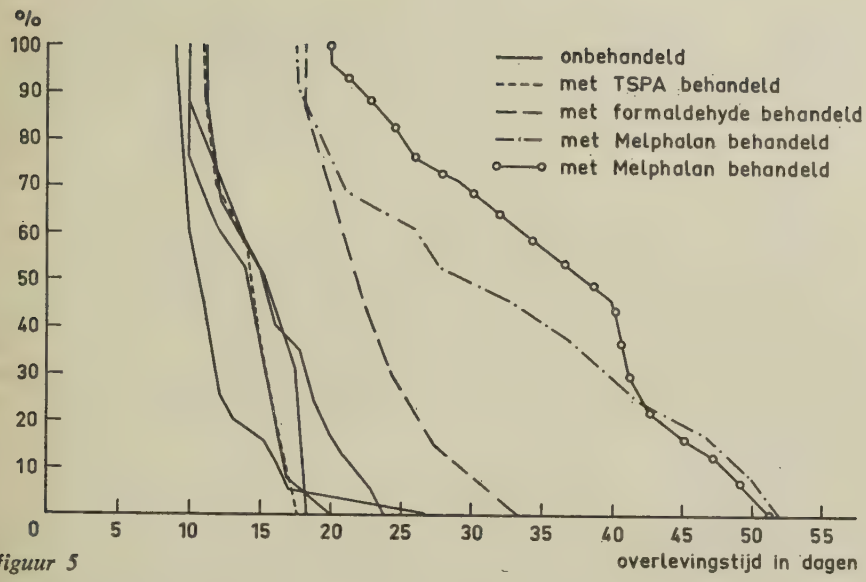
OVERLEVINGSTIJDEN BIJ PROEF C2

	Onbehandeld		Melphalan 4,0 mg/kg l.g.	
	Aantal dieren	Overlevingstijd in dagen	Aantal dieren	Overlevingstijd in dagen
	3	10	1	17
	1	11	1	18
	1	12	2	21
	1	14	1	26
	2	15	1	28
	2	16	1	33
	2	17	1	37
	1	20	2	42
			1	47
			1	50
			1	52
Totaal	13	183	13	434
Gemiddeld		14,0		33,4

Het verschil in overlevingstijd is hier eveneens zeer significant: $P < 0{,}0001$ (Wilcoxon). Grafisch wordt de afsterving van beide groepen in figuur 4 weergegeven, terwijl in figuur 5 alle afstervingscurven, die bij deze experimenten werden vastgesteld, zijn getekend. De curven van de met Melphalan behandelde groepen hebben vrijwel eenzelfde vorm, en laten duidelijk het gunstige effect van deze stof op de overlevingstijd zien.



figuur 4



figuur 5

B. *Tumorgewichten en overlevingstijden*

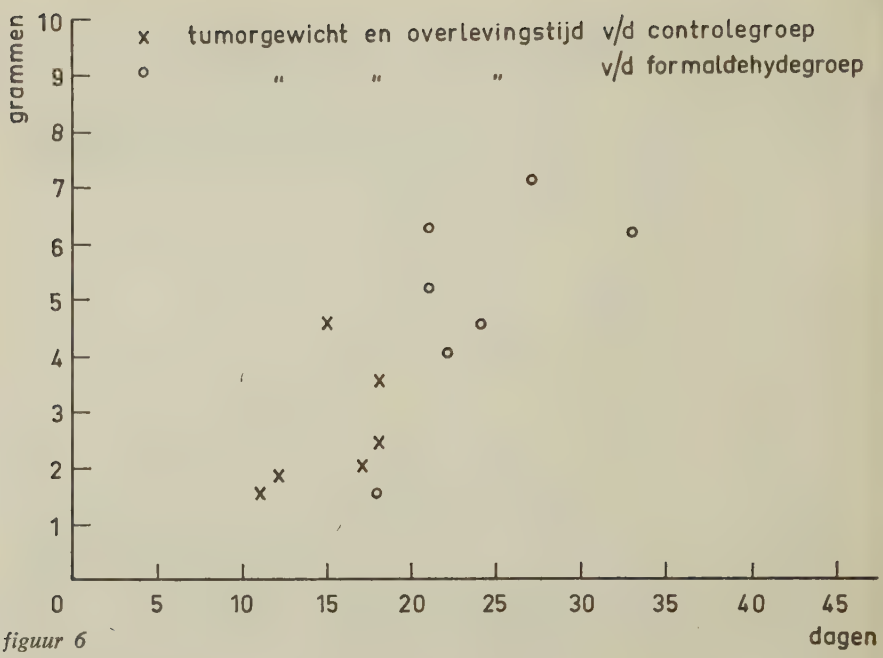
TUMORGEWICHTEN EN OVERLEVINGSTIJDEN BIJ PROEF A

	Gespoeld met physiologisch zout			Gespoeld met formaldehyde 0,1%			
	Nr. en geslacht v/h proefdier	Overlevingstijd in dagen	Tumorgewicht in gr.	Nr. en geslacht v/h proefdier	Overlevingstijd in dagen	Tumorgewicht in gr.	
	1 ♂	11	1,5	1 ♀	18	1,5	
	2 ♂	12	1,8	2 ♀	21	5,1	
	3 ♂	15	4,5	3 ♀	21	6,2	
	4 ♀	17	2,0	4 ♀	22	4,0	
	5 ♀	18	2,4	5 ♀	24	4,5	
	6 ♀	18	3,5	6 ♀	27	7,1	
				7 ♂	33	6,1	
Totaal	6	91	15,7	7	166	34,5	
Gemiddeld		15,1	2,6		23,7	4,9	

In figuur 6 (bl. 64) zijn de gegevens uit deze tabel grafisch weergegeven.

Statistisch werd nagegaan, of er binnen elk van de twee groepen een positieve correlatie aanwezig was tussen de tumorgewichten en de overlevingstijden. *). Deze correlatie kon niet vastgesteld worden (controlegroep $P = 0{,}10$, formaldehydegroep $P = 0{,}15$); waarschijnlijk waren de groepen te klein om een verband tot uiting te doen komen.

*) Bij het onderzoek naar deze correlatie werd steeds gebruik gemaakt van de rangcorrelatietoets van Kendall.



figuur 6

TUMORGEWICHTEN EN OVERLEVINGSTIJDEN BIJ PROEF B

	Onbehandeld			TSPA 2,0 mg/kg l.g.			
	Nr. en geslacht v/h proefdier		Overlevingstijd in dagen	Tumorgewicht in gr.	Nr. en geslacht v/h proefdier		Overlevingstijd in dagen	Tumorgewicht in gr.
	1	♂	10	0,3	1	♂	11	1,5
	2	♂	10	0,4	2	♂	12	0,9
	3	♂	13	1,9	3	♂	12	1,5
	4	♂	13	2,0	4	♀	12	1,6
	5	♂	13	3,0	5	♂	12	2,0
	6	♂	13	3,1	6	♂	13	2,0
	7	♀	14	2,0	7	♀	14	4,1
	8	♀	15	2,1	8	♀	15	1,4
	9	♂	16	3,5	9	♂	15	3,6
	10	♀	16	5,5	10	♀	15	4,3
	11	♀	18	4,0	11	♂	16	3,7
	12	♀	19	6,3	12	♀	16	4,0
	13	♀	19	4,0	13	♀	16	4,3
	14	♀	20	5,1	14	♀	17	4,3
	15	♂	21	4,4	15	♀	17	5,5
	16	♂	23	3,7	16	♂	18	3,5
	17	♂	24	7,5	17	♀	18	4,4
Totaal	17		277	58,8	17		239	52,6
Gemiddeld			16,2	3,5			14,0	3,1

Figuur 7 (bl. 66) geeft de gegevens uit vorenstaande tabel grafisch weer.

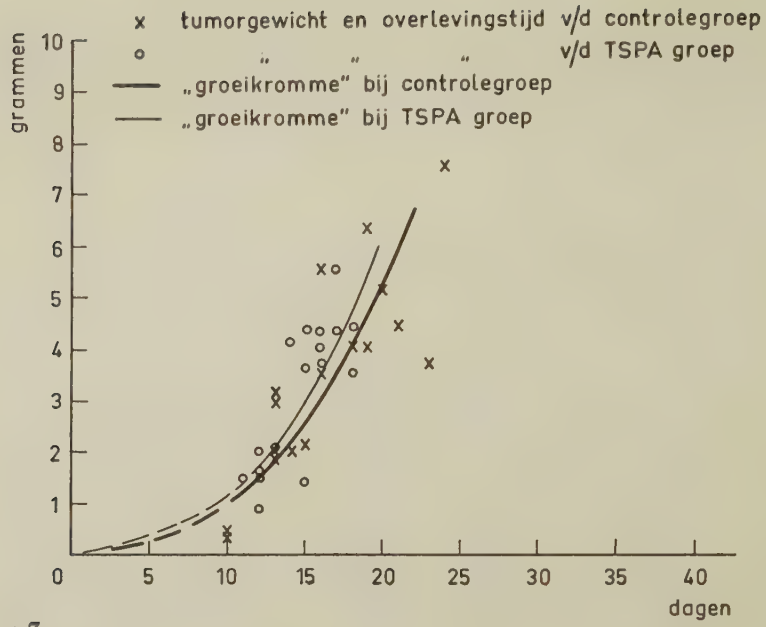
Statistisch is een positieve correlatie binnen elk der twee groepen van proef B aanwezig tussen tumorgewicht en overlevingstijd. Voor de controlegroep is $P = 0{,}0001$ en voor de TSPA groep is $P = 0{,}001$.

TUMORGEWICHTEN EN OVERLEVINGSTIJDEN BIJ PROEF C1

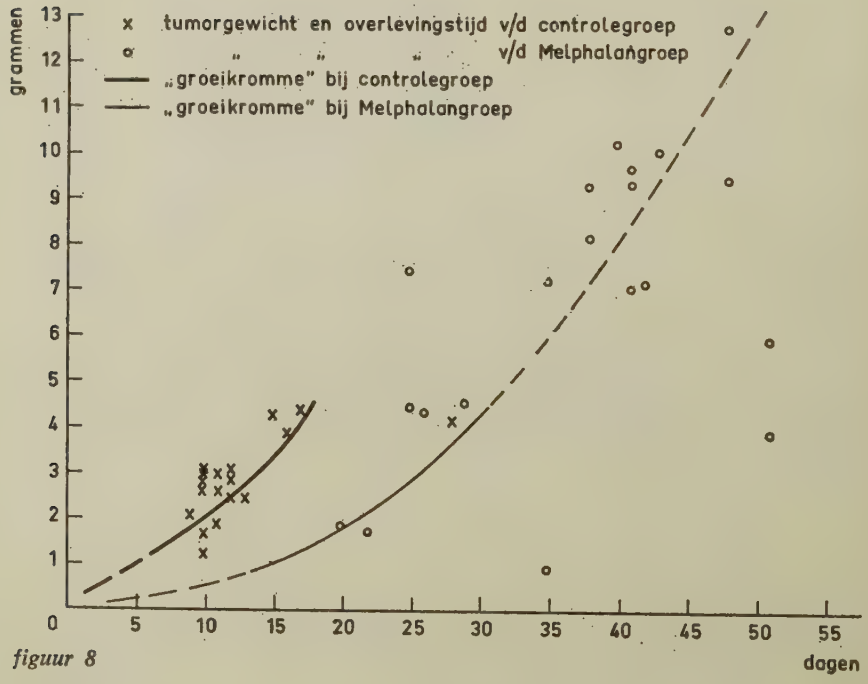
	Onbehandeld			Melphalan 4,0 mg/kg l.g.		
	Nr. v/h proefdier	Overlevingstijd in dagen	Tumorgewicht in gr.	Nr. v/h proefdier	Overlevingstijd in dagen	Tumorgewicht in gr.
	1	9	2,0	1	20	1,8
	2	10	1,2	2	22	1,7
	3	10	1,2	3	25	4,4
	4	10	1,6	4	25	7,4
	5	10	2,6	5	26	4,3
	6	10	2,8	6	29	4,5
	7	10	2,9	7	35	1,9
	8	10	3,0	8	35	7,2
	9	11	1,8	9	38	8,1
	10	11	2,5	10	38	9,2
	11	11	2,9	11	40	10,2
	12	12	2,4	12	41	7,0
	13	12	2,8	13	41	9,3
	14	12	3,0	14	41	9,7
	15	12	3,0	15	42	7,1
	16	13	2,4	16	43	10,0
	17	15	4,2	17	48	9,4
	18	16	3,8	18	48	12,7
	19	17	4,3	19	51	3,9
	20	28	4,1	20	51	5,9
Totaal	20	249	54,5	20	739	135,7
Gemiddeld		12,4	2,7		36,9	6,8

Figuur 8 (bl. 66) geeft deze gegevens grafisch weer.

Er is een significant positieve correlatie binnen elk van deze beide groepen, wat betreft tumorgewicht en overlevingstijd (voor controles $P = = 0{,}006$; voor behandelde dieren $P = 0{,}012$).



figuur 7



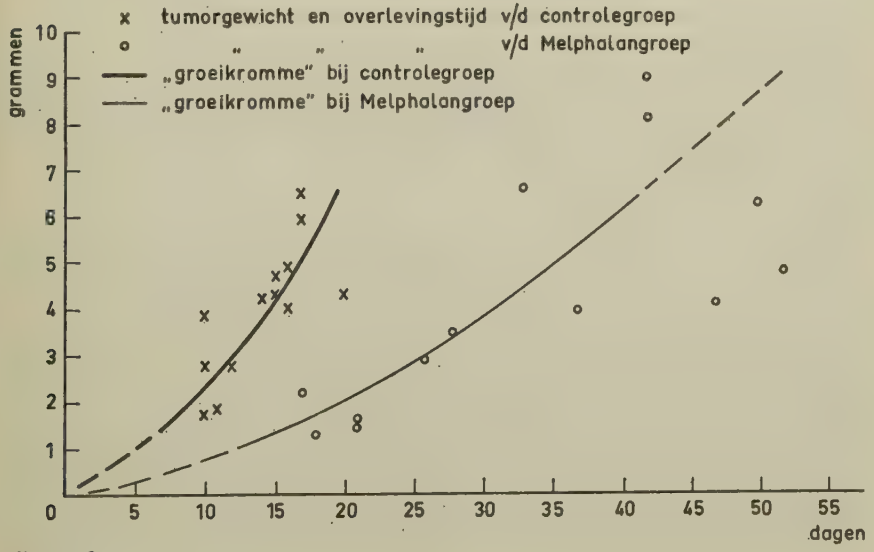
figuur 8

TUMORGEWICHTEN EN OVERLEVINGSTIJDEN BIJ PROEF C2

	Onbehandeld			Melphalan 4,0 mg/kg l.g.		
	Nr. v/h proefdier	Overlevingstijd in dagen	Tumorgewicht in gr.	Nr. v/h proefdier	Overlevingstijd in dagen	Tumorgewicht in gr.
	1	10	1,7	1	17	2,2
	2	10	2,8	2	18	1,3
	3	10	3,9	3	21	1,4
	4	11	1,8	4	21	1,6
	5	12	2,8	5	26	2,9
	6	14	4,2	6	28	3,5
	7	15	4,3	7	33	6,6
	8	15	4,7	8	37	4,0
	9	16	4,0	9	42	8,1
	10	16	4,9	10	42	9,0
	11	17	5,9	11	47	4,1
	12	17	6,5	12	50	6,3
	13	20	4,3	13	52	4,8
Totaal	13	183	51,8	13	434	55,8
Gemiddeld		14,0	4,0		33,4	4,3

Bovenstaande tabel correspondeert met figuur 9.

Ook hier is weer binnen elke groep een significante correlatie van hogere tumorgewichten bij langere overlevingsduur aanwezig; voor de controledieren is $P = 0{,}0008$, en voor de met Melphalan behandelde muizen is $P < 0{,}002$.



figuur 9

De conclusie uit het voorgaande te trekken is, dat bij de controle- zowel als bij de therapiegroepen van de proeven B en C de tumorgewichten toenemen, naarmate de dieren langer leven.

Beschouwt men in figuur 8 de punten, die voor elk dier uit de controlegroep de gewogen tumormassa en de bijbehorende overlevingstijd aangeven, dan is in deze figuur een kromme te tekenen waaromheen die punten gegroepeerd liggen, gezien het feit, dat er een positieve correlatie aangetoond is tussen tumorgewichten en overlevingstijd. Deze kromme zal er ongeveer uitzien als in de figuur is aangegeven. Hetzelfde is mogelijk met de punten, gevormd door tumormassa en overlevingstijd van de dieren uit de Melphalangroep. Deze krommen weerspiegelen in elke groep de toename der tumormassa, naarmate de dieren langer overleven, en kunnen aangeduid worden als groeikrommen. Zij zijn slechts vergelijkbaar tot het punt waar de groeikromme der controledieren ophoudt, aangezien het beloop hiervan niet verder vastgesteld kan worden, daar de dieren niet langer overleven. In dit gebied nu liggen alle voorkomende punten van de behandelde groep verder naar rechts, zodat de groeikromme van de Melphalangroep onder die van de controlegroep komt te liggen.

Nog veel sterker spreekt dit voor de tweede proefserie, die weergegeven is in figuur 9.

Het meer naar rechts verschoven zijn van de groeikrommen van de behandelde dieren in de figuren 8 en 9 wil dus zeggen, dat er (voorzover de vergelijking mogelijk is) minder gezwelmassa gevormd wordt in dezelfde tijd. Dit is te verklaren door aan te nemen, dat:

a. de tumor bij de behandelde muizen langzamer groeit dan bij niet behandelde dieren, òf
b. de aanvangshoeveelheid gezwelweefsel bij de behandelde muizen geringer is, waardoor, bij eenzelfde groeisnelheid, in een bepaald tijdsbestek minder tumormassa gevormd wordt, òf
c. een combinatie van beide.

Zou de tumor in de therapiegroep langzamer groeien, dan moet men aannemen, dat er òf een verandering bij de ingebrachte tumorcellen heeft plaatsgevonden die bij de celdeling wordt doorgegeven, òf dat het chemotherapeuticum gedurende de gehele overlevingsperiode heeft ingewerkt. Bij de experimenten in de litteratuur vermeld, is voor geen van beide veronderstellingen een aanknopingspunt te vinden. Het is onwaarschijnlijk, dat de stof langere tijd zou ingewerkt hebben, aangezien men heeft waargenomen, dat het phenyl-alanine-mosterd niet langer dan ongeveer acht uur na de inspuiting werkzaam is. Ook het feit, dat na ongeveer drie weken bij patiënten een regeneratie van het beenmerg optreedt, wijst er op, dat de inwerking niet constant en niet gedurende lange tijd plaats vindt.

Het alternatief is veel meer in overeenstemming met uit de litteratuur bekende feiten. Aangetoond is, dat een kankerchemotherapeuticum het beste werkt, indien het kort na de enting wordt toegediend. Men kon in sommige gevallen dan zelfs de tumorgroei geheel voorkómen. Dit wijst er op, dat de ingebrachte cellen gedood worden, althans hun celdeling gestoord wordt.

Dit is eveneens in overeenstemming met de beschreven experimenten. Zowel na spoelen van de buikholte met formaldehyde als na Melphalan toediening, werd een veel minder gedissemineerd groeipatroon verkregen dan bij de controledieren. De beelden waren geheel identiek. Men mag aannemen, dat het formaldehyde celdodend werkt; bij de hiermede behandelde muizen waren er kennelijk een veel kleiner aantal punten aanwezig waar de tumorgroei begonnen was, d.w.z.: er waren minder implantatie-metastasen. Hetzelfde beeld is aanwezig bij de met Melphalan behandelde dieren; ook hier zal waarschijnlijk bij eenzelfde groeisnelheid van de tumor als die van de controledieren, in een bepaald tijdsbeloop minder tumormassa gevormd zijn dan bij de controlemuizen, doordat in het begin de uitgroei van vele cellen is gestoord, waardoor er minder tumorweefsel aanwezig was bij de aanvang van de tumorgroei.

Beziet men de groeikrommen van de controle- en van de met TSPA behandelde dieren in figuur 7, dan blijken deze vrijwel samen te vallen, aangezien statistisch kon worden aangetoond, dat de puntenwolk van de therapiegroep niet significant verschoven is (in welke richting dan ook) ten opzichte van die van de controlegroep. Gezien de proefresultaten was dit ook te verwachten.

Bij alle intra-peritoneaal geënte dieren werd vrijwel zonder uitzondering ter hoogte van de plaats waar de enting geschiedde, een grote implantatie-metastase op het peritoneum parietale gezien. Dit was ook de plaats waar bij de langer levende dieren vaak grote subcutaan en intracutaan gelegen tumoren voorkwamen. In hoeverre deze laatste tumoren zijn op te vatten als te zijn ontstaan ten gevolge van directe enting in het steekkanaal of als uitgaande van het op het peritoneum parietale geënte gezwel, is niet met zekerheid vastgesteld.

Uit het beeld bij de vroeg overleden dieren, waar veelal een tumorknobbeltje op het peritoneum parietale werd gezien zonder groei in de meer oppervlakkig gelegen structuren, krijgt men de indruk, dat dit laatste het geval is. Er werd bovendien slechts tweemaal een tumortje in subcutis of huid waargenomen, waarvan een verbinding met de intra-peritoneaal gelegen tumormassa niet met zekerheid kon worden vastgesteld (proef C 2).

De plaats waar het chemotherapeuticum of het placebo werd toegediend is eveneens een voorkeursplaats van entmetastasen op het peritoneum parietale, hoewel veel minder duidelijk.

Men mag aannemen, dat het beschadigde peritoneum een locus minoris resistentiae vormt voor implantatiemetastasen. Dat de inoculatieplaats hierbij als eerste geldt, is te verklaren doordat de hier ter plaatse ingebrachte cellen zich op het wondvlak van het peritoneum nestelen en door fibrinevlokjes worden beschermd voor het een uur later ingebrachte chemotherapeuticum. Dat de cellen, gelegen achter milt en lever eveneens slechter bereikbaar zijn voor de ingebrachte stof, is duidelijk.

ONDERZOEK OMTRENT KANKERGROEI IN GEÏNFECTEERD MILIEU

Proefopstelling

Een tweede reeks experimenten diende om de groei van geïnoculeerde kankercellen in een geïnfecteerd milieu te onderzoeken.

Uit de litteratuur blijkt, dat prae-operatieve desinfectie van de darm de kans op tumorgroei in of nabij de naad doet toenemen, als tevoren levende tumorcellen in de darm worden gebracht.

Wij hebben getracht dit onderzoek aan te vullen met enige andere proefnemingen. Bij de te beschrijven experimenten is de tumorgroei niet intra-abdominaal bestudeerd, maar deze is nagegaan bij subcutane inoculatie, aldus het te onderzoeken probleem elders situerend. Zouden ook nu de bovengenoemde waarnemingen bevestigd kunnen worden, dan zou dit steun geven aan de veronderstelling, dat daarbij een meer algemeen geldend proefresultaat werd verkregen.

Alvorens over te kunnen gaan tot de uitvoering van een experiment met een voldoende groot materiaal, werden eerst verschillende proefvoorwaarden nader bestudeerd door een aantal kleine proefnemingen. Getracht werd bij mannelijke en vrouwelijke F_1 muizen een bacteriële, gelocaliseerde ontsteking te verkrijgen.

1. Een bacterieel proces was wenselijk, om een vergelijking te kunnen treffen met andere waarnemingen, die omtrent kankergroei in een met bacteriën geïnfecteerd milieu werden verricht. Aangezien het te bestuderen probleem vooral betrekking had op de intra-peritoneale groei van entmetastasen, waar een optredende bacteriële infectie vrijwel steeds te wijten zal zijn (geweest) aan darmbacteriën, werd de faeces van 5 willekeurige F_1 muizen gekweekt. Viermaal werd E. coli en vijfmaal werd een enterococcus geïsoleerd; andere micro-organismen kwamen minder frequent voor. De keuze viel hierdoor op een mengsel van E. coli en enterococcus, waarvan de stammen gedurende de periode dat geëxperimenteerd werd, bewaard werden, zodat bij alle te beschrijven proeven van één stam is uitgegaan. Er werd steeds gebruik gemaakt van een 1 dag oude bouilloncultuur, al dan niet verder verdund.

Beide bacteriestammen waren gevoelig voor streptomycine en zijn dit gebleven gedurende de periode, dat zij bij de experimenten gebruikt werden.

2. Om een goede beoordeling van de tumorgroei in een geïnfecteerd milieu mogelijk te maken, was het nodig een gelocaliseerde ontsteking op te wekken, waardoor bij de proefdieren tevens de mogelijkheid tot herstel van de infectie geboden werd. Bij proeven, waarbij verse faeces subcutaan was ingebracht, was reeds gebleken dat, om een goede locale ontsteking te verkrijgen, het wenselijk was een corpus alienum bij te voegen.

Het bleek, dat gelei van 2% w/v Carboxy-Methyl-Cellulosum van de hoogvisceuze soort, in aqua-dest. (CMC-gelei), zeer goed als corpus alienum voldeed. Het voordeel van het gebruik van deze gelei was, dat de bacterie- en tumorsuspensies goed gelocaliseerd konden worden gehouden bij de subcutane toediening. Deze toediening vond steeds plaats onder de rughuid. Bij enige muizen werd 1 cc gelei subcutaan ingebracht, zonder dat deze er nadelige gevolgen van ondervonden: het gewicht werd niet nadelig beïnvloed, en de dieren bleven er gezond uitzien. Drie weken na de inspuiting werden alle dieren afgemaakt en werd sectie verricht. Hierbij bleek er nog een kleine geleirest aanwezig te zijn, zonder tekenen van een actief ontstekingsproces in de omgeving.

Inspuiting van gelei veroorzaakte dus geen tekenen van een acute ontsteking bij de proefdieren en benadeelde hun gezondheid niet.

3. Vervolgens werd nagegaan, of een tumorcelsuspensie, bereid op de reeds beschreven wijze, na gemengd te zijn met gelei, nog in staat was om tumorgroei te veroorzaken. Eén der onderstaande mengsels werd achtereenvolgens telkens bij een ander proefdier ingespoten:

¾ cc tumorcelsuspensie en ¾ cc gelei

½ cc tumorcelsuspensie en ½ cc gelei

¼ cc tumorcelsuspensie en ¼ cc gelei

Bij alle dieren trad na enige tijd fraaie locale tumorgroei op, die macroscopisch niet te onderscheiden was van de groei bij drie controledieren, die alleen de tumorcelsuspensie hadden ontvangen.

4. De hieropvolgende oriënterende proef was er op gericht om na te gaan, of zich een gelocaliseerd ontstekingsproces ontwikkelde, indien een mengsel van gelei, van E. coli- en van enterococcuscultuur werd ingespoten; voorts werd nagegaan hoe groot de benodigde hoeveelheid bacteriecultuur zou moeten zijn en hoe het gedrag van proefdier en de ontsteking hierbij zou zijn. Gebruik werd gemaakt van 24 uur oude, onverdunde bouilloncultures van respectievelijk E. coli en enterococcus; tevens werden verdunningen hiervan gebruikt van 1 : 1000, 1 : 100 en 1 : 10. Per dier werd in totaal 0,5 cc bouilloncultuur ingespoten, nadat deze hoeveelheid was gemengd met 1 cc gelei.

De proefopzet was als volgt:

Groep nr.	Proefdier nr.	Verdunning der coli-cultuur	Verdunning der entero-coccencult.	Hoeveelheid ingespoten colicultuur	Hoeveelheid ingespoten enterococcen-cultuur
I	1,2	1 : 1000	1 : 1000	1/4 cc	1/4 cc
II	3,4	1 : 100	1 : 100	1/4 cc	1/4 cc
III	5 t/m 11	1 : 10	1 : 10	1/4 cc	1/4 cc
IV	12 t/m 14	onverdund	onverdund	1/4 cc	1/4 cc

Negen dagen na de inspuiting werden de muizen die tot Groep I en II behoorden, afgemaakt en onderzocht. De dieren uit groep I vertoonden geen spoor van ontsteking, terwijl dit eveneens het geval was met dier nr. 3 van groep II. Muis nr. 4 van groep II vertoonde een klein maar duidelijk abscesje, waaruit alleen E. coli kon worden gekweekt.

Zestien dagen na de injectie werden de muizen uit de groepen III en IV opgeofferd. De resultaten waren aldus:

Groep III

muis nr. 5: fraai subcutaan absces.

„ nr. 6: genezend ontstekingsgebied subcutaan, zonder duidelijke abscesvorming; huid intact.

„ nr. 7: doorgebroken absces, met neiging tot reëpithelisatie.

„ nr. 8: geringe ontstekingsresten, zonder duidelijke abscedering; huid gaaf.

„ nr. 9: geen duidelijke ontstekingsverschijnselen.

„ nr. 10: zeer klein abscesje, niet doorgebroken.

„ nr. 11: geringe ontstekingsrest.

Groep IV

muis nr. 12: goed ontwikkeld, subcutaan gelegen abscesje met actieve ontstekingsverschijnselen; niet doorgebroken.

„ nr. 13: fraai gelocaliseerd absces, dat bijna is geperforeerd.

„ nr. 14: flinke ontstekingsresten na perforatie.

Voorzover er nog duidelijke ontstekingsverschijnselen aanwezig waren, werd ook nu wederom gekweekt op micro-organismen. Nimmer werd hierbij enterococcus teruggevonden, daarentegen kon steeds E. coli teruggekweekt worden. Dit leidde tot het besluit, uitsluitend met E. coli verder te experimenteren en wel met de onverdunde bouilloncultuur. Voor een goede proefopstelling was het n.l. noodzakelijk, dat vrijwel alle dieren, die

een bacteriesuspensie kregen ingespoten, ook inderdaad een duidelijk gelocaliseerd ontstekingsproces ontwikkelden. Gezien de resultaten van deze proef was een 10 maal verdunde bacteriecultuur hiervoor niet toereikend.

De gezondheid van de proefdieren leed slechts gedurende de eerste week. Daarna begonnen zij zich weer normaal te voeden, kregen de pelzen hun glans terug en werden ze weer even levendig als voorheen.

5. De hoeveelheid in te brengen onverdunde bouilloncultuur van E. coli moest nu nader gepreciseerd worden. Achtereenvolgens werd ingebracht onder de rughuid bij:

3 muizen een mengsel van ¼ cc colicultuur en 1 cc gelei
3 muizen een mengsel van ½ cc colicultuur en 1 cc gelei
3 muizen een mengsel van 1 cc colicultuur en 1 cc gelei

De dieren werden twee weken later opgeofferd; het bleek, dat alle muizen die een mengsel van colibacteriën en gelei hadden ontvangen, fraaie abscessen vertoonden. (Foto 9) Tussen de drie sub-groepen was weinig verschil te zien; uit alle abscessen werd E. coli teruggekweekt, gevoelig voor streptomycine. Niet nagegaan werd of wijziging van de verhouding van de hoeveelheden bacterie-cultuur en gelei een meer of minder goede abscesvorming zou geven.

Van enige dieren die een duidelijke abscesvorming te zien gaven, werden histologisch longen, lever, nier en milt onderzocht, om na te gaan of zich metastatische abscessen hadden ontwikkeld. In de gemaakte coupes werden echter geen afwijkingen aangetroffen.

Samengevat blijkt, dat het mogelijk is bij gebruik van 0,5 cc 24 uur oude onverdunde bouilloncultuur van E. coli, gemengd met 1 cc CMC gelei, een fraai gelocaliseerd absces te verkrijgen, dat na doorbraak spontaan neiging tot genezing vertoont. Het dier gaat niet te gronde aan dit absces, maar herstelt zich na een korte periode van ernstig ziek zijn. Bovendien blijken de abscessen in een voldoend korte tijd te ontstaan om de tumorgroei in dit gebied te bestuderen.

6. Aangezien het de bedoeling was, tegelijkertijd bij een aantal muizen ½ cc coli-bouilloncultuur en ½ cc tumorcelsuspensie in 1 cc gelei in te brengen, terwijl een controlegroep ½ cc bouillon en ½ cc tumorsuspensie in 1 cc gelei zou ontvangen, werd bij vier muizen een mengsel ingespoten van ½ cc bouillon en ½ cc physiologisch zout in 1 cc gelei, om de reactie op deze te gebruiken vehicula na te gaan. Na twee weken werden 2 dieren opgeofferd; een week later de overigen. Bij de sectie bleek nog een gedeelte van de ingebrachte massa aanwezig te zijn. Een volledige resorptie had dus niet plaats gevonden. Bij histologisch onderzoek bleek een holte aanwezig te zijn, die begrensd werd door een laag van dichte bindweefselvezels,

waarschijnlijk door compressie ontstaan. Deze laag bevatte zeer veel macrophagen. Vervolgens was een laag losmazig bindweefsel te zien, waarin een minder groot aantal macrophagen voorkwamen. De hierna volgende lagen waren respectievelijk spierlaag, corium en epidermis. Het ontstekingsinfiltraat was gering en bestond in hoofdzaak uit de genoemde macrophagen. Er trad geen abscedering of perforatie op.

7. Ook hoopten wij in het eindexperiment te kunnen nagaan of antibiotica, voor het geval de tumor in het geïnfecteerde milieu slechter zou groeien, een gunstige invloed op deze groei zouden kunnen uitoefenen ten gevolge van hun antibacteriële werking. De keuze viel op streptomycine.

Het was niet te verwachten, dat toediening van deze stof een ontstekingsproces zou voorkómen, aangezien er een zeer groot aantal bacteriën die tot een snelle abscedering leidden, werd ingebracht. Bovendien waren deze omgeven door een betrekkelijk grote hoeveelheid gelei, waardoor de bloedvoorziening ter plaatse vrijwel afwezig was, zodat het streptomycine niet tot de ingebrachte bacteriën kon doordringen. Aangezien de oriënterende proeven echter veelbelovend waren, is toch gebruik gemaakt van een dergelijke proefopstelling. Eerst werd nagegaan, of streptomycine een nadelige invloed uitoefende op het proefdier. Hiervoor werd gedurende vier dagen bij enige dieren subcutaan éénmaal daags een oplossing van streptomycine in physiologisch zout ingespoten. De sterkte van deze oplossing was zodanig, dat per dag een dosis gegeven werd van resp. 20, 40 en 80 mg/kg lichaamsgewicht. De ingespoten dieren bleken tijdens een observatieperiode van 8 weken geen enkel teken van onwelzijn te vertonen.

Vervolgens werd bij 3 muizen een mengsel van gelei en ½ cc 10 maal verdunde colibouilloncultuur ingespoten, terwijl bij 2 muizen ½ cc onverdunde coli-bouilloncultuur in gelei werd ingebracht. Alle dieren kregen op de dag van de toediening en gedurende 3 dagen erna dagelijks 40 mg/kg l.g. streptomycine subcutaan ingespoten op een plaats, gelegen tegenover die waar de bacteriën waren ingebracht. Twee weken later werden alle dieren opgeofferd.

De drie muizen, die een tienmaal verdunde colicultuur hadden ontvangen, vertoonden geen tekenen van actieve ontsteking en er kon geen E. coli teruggekweekt worden.

Bij een dier uit de tweede groep werd een duidelijke ontstekingsrest gevonden, het andere dier vertoonde dit beeld niet. Bij geen van beide werd E. coli teruggekweekt.

Deze kleine proefserie is te optimistisch geinterpreteerd, wat betreft de gunstige werking van het streptomycine op het ontstekingsproces, afgezien van het feit, dat bij het eindexperiment de dosis colibacillen groter werd genomen dan hier bij drie van de vijf dieren het geval was. Het zal dan ook blijken, dat streptomycine-toediening in een grotere serie geen duidelijke invloed heeft gehad op het ziektebeloop.

Na de voorbereidende proeven kon worden overgegaan tot het opstellen van een experiment, waarin het te bestuderen probleem nader kon worden onderzocht. Drie groepen F_1 muizen van respectievelijk 21 -21- en 24 stuks werden aselect gekozen. Het totaal van 66 dieren bestond uit 20 vrouwelijke en 46 mannelijke muizen. Er werd onder steriele voorwaarden een tumorcelsuspensie bereid, door 16 gram tumor fijn te knippen en met wat physiologisch zout gedurende 3 minuten in een mortier te wrijven; hierna werd de tumorbrei door twee lagen nylongaas *) gezeefd en aangevuld met physiologisch zout tot een suspensie van 40 cc was verkregen.

De suspensie werd vervolgens gemengd met 80 cc steriele CMC-gelei. Van dit mengsel werd een gedeelte genomen, waarbij zoveel steriele bouillon gevoegd werd, dat de verhouding gelei : tumorcelsuspensie : bouillon = 2 : 1 : 1 bedroeg. Het overige deel werd, in plaats van met bouillon, gemengd met een 24 uur oude E. coli bouilloncultuur, en wel zodanig, dat de verhouding gelei : tumorcelsuspensie : colicultuur eveneens 2 : 1 : 1 was. De suspensies werden op ijs bewaard gedurende in totaal 90 minuten.

Een groep van 21 dieren kreeg van het eerste mengsel onder de rughuid 2 cc ingespoten. Deze groep zal verder worden aangeduid als controlegroep. De overige muizen kregen op dezelfde wijze 2 cc van het tweede mengsel toegediend. Bij de groep van 24 dieren vond geen verdere behandeling plaats; deze zal worden aangeduid als coligroep. De muizen uit de tweede groep van 21 dieren daarentegen, hadden de dag vóór de inspuiting van het tumor-bacteriemengsel subcutaan streptomycine, opgelost in steriel physiologisch zout, toegediend gekregen in een dosis van 40 mg/kg l.g. De hoeveelheid ingebrachte oplossing bedroeg ongeveer 0,2 cc. De inspuiting werd herhaald op de dag van de inoculatie en de beide volgende dagen, waarbij er zorg voor werd gedragen, dat de injectie aan de andere kant plaats vond dan waar de tumorbacteriesuspensie was gespoten. Deze groep van dieren zal in het vervolg streptogroep worden genoemd.

De dag na de inoculatie waren alle muizen die de colicultuur hadden ontvangen, zeer ziek. Dit hield enige dagen aan, maar omstreeks de zevende dag waren alle dieren weer hersteld. Er werd geen verschil in reactie opgemerkt tussen de dieren van de coligroep en die van de streptogroep.

Na een week begonnen bij deze beide groepen de eerste abscessen door te breken. Dit geschiedde in de loop van de tweede week bij de meeste muizen uit de coli- en de streptogroep. Direct na de doorbraak trad een begin van genezing op met reëpithelisatie van de huid.

Tijdens de periode, dat de dieren geobserveerd werden, vielen 8 muizen

*) 51 gauge — 15 denier.

af, ten dele doordat deze werden gebruikt voor histologisch onderzoek, ten dele doordat zij overleden tengevolge van andere oorzaken.

Bij het beëindigen van de proef op de 20ste dag na de inoculatie waren 58 muizen geschikt voor beoordeling, als volgt verdeeld:

controlegroep	18
coligroep	20
streptogroep	20

Op het ogenblik, dat de proef beëindigd werd, verkeerden alle overgebleven muizen in goede conditie. Er kon aangenomen worden, dat er geen mortaliteit meer zou optreden ten gevolge van de infectie met colibacillen; bij histologisch onderzoek bleek achteraf eveneens, dat de ontsteking over het hoogtepunt heen was.

De dieren uit de controlegroep vertoonden op de 20ste dag allen een sterke tumorgroei. Deze was bij enige muizen zo uitgebreid, dat verwacht kon worden, dat ze spoedig aan tumorgroei te gronde zouden gaan. Om de groei bij de drie groepen met elkaar te kunnen vergelijken, werden alle muizen gelijktijdig afgemaakt, voor er sterfte tengevolge van tumorgroei optrad. Omgekeerd mocht de proef ook niet te snel beëindigd worden, om zekerheid te hebben, dat de muizen uit coli- en streptogroep niet aan de infectie doodgingen, waardoor de tumor niet de kans zou gehad hebben om uit te groeien, tengevolge waarvan een juiste beoordeling van het resultaat belemmerd zou worden.

De totale hoeveelheid gevormde tumormassa werd bepaald door de tumor uit te pellen, waarbij de huid, voorzover hier ingroei had plaats gevonden, werd meegenomen. Dit geschiedde eveneens met het ontstekingsinfiltraat indien dit aanwezig was, aangezien het onmogelijk was tumor en infiltraat van elkaar te scheiden. De uitgeprepareerde massa werd gewogen tot op 0,1 gram nauwkeurig. Weliswaar was dit geen geheel betrouwbare maat voor de bepaling van de hoeveelheid gevormde tumormassa, maar aan deze methode waren de geringste bezwaren verbonden. Het gewicht van het infiltraat was zeer klein, vergeleken bij de tumorgewichten zoals deze in de controlegroep werden gezien. Bovendien werd bij de coli- en streptogroep een hoger totaalgewicht bepaald, aangezien hier steeds infiltraat aanwezig was in tegenstelling tot de controlegroep. Wilden wij aantonen, dat er bij de infectiegroep minder tumorgroei was dan bij de controlegroep, dan zou deze wijze van bepalen eerder in ons nadeel zijn. Zou ondanks dit er toch een statistisch significant resultaat gevonden worden, dan zou dit zeker niet geflatteerd zijn.

Aangezien de meeste abscessen zich reeds ontledigd hadden bij het beëindigen van de proef, en er fraaie reëpithelisatie was, werd er geen poging ondernomen om E. coli terug te kweken.

De dieren werden met aetherdamp gedood en daarna gewogen. Vervolgens werd de tumor met eventuele ontstekingsmassa uitgeprepareerd en

A. RESULTATEN CONTROLEGROEP

Sectie

Diernr. en geslacht	Tumor-groei	Tumor-gewicht in gr.	Ontste-kings-versch.	Ulceratie	Sectie bevindingen	Opmerkingen
♀ 1	+	2,6	—	—	g.b.	
♀ 2	++	9,8	—	—	„	
♀ 3	+++	14,3	—	—	„	
♀ 4	+	5,3	—	—	„	
♀ 5	+	1,4	—	—	„	
♂ 6	++	9,1	—	—	„	
♂ 7	+++	16,5	—	—	„	
♂ 8	++	7,0	—	—	„	
♂ 9	+	1,4	—	+	„	
♂ 10	+	6,1	—	—	„	
♂ 11	+	2,2	—	—	„	
♂ 12	+	3,0	—	—	„	
♂ 13	++	7,0	—	—	„	
♂ 14	+	1,9	—	—	„	
♂ 15	++	5,8	—	—	„	
♂ 16	+	4,5	—	—	subsereuse plaques op dunne darm	bij histologisch onderzoek bleken de plaques uit lympheweefsel te bestaan
♂ 17	++	9,6	—	—	g.b.	
♂ 18	+	1,2	—	—	„	

Histologie

Tumor-groei	Graad v. necrose in tumor	Infiltr. buiten de tumor	Epidermis in onderzochte coupes	Holtevorming in onder-zochte coupes	Onderzochte organen	Opmerkingen
+	+++	++	intact	aanwezig		fraaie celnestjes in holte-wand
+	+++	++	„	aanwezig		enkele celnestjes in holte-wand
+	+++	++	„	onduidelijk		
+	+++	+	„	onduidelijk	milt g.b. nier g.b. lever g.b. long g.b.	
+	+++	+	„	aanwezig		fraaie celnestjes in holte-wand
+	+++	++	„	aanwezig		enige celnestjes in holte-wand
+	+++	+	„	aanwezig	milt g.b. nier g.b. lever: gestuwd long g.b.	holte rondom volgegroeid met tumor
+	++	+	„	afwezig		
+	++	++	defect, met korst bedekt	aanwezig		rand van tumorweefsel om de holte
+	+++	++	intact	aanwezig	milt g.b. nier g.b. long: wat weinig lucht-houdend lever g.b.	
+	+++	+	„	aanwezig		necrosehaarden om de holte gelegen
+	+++	+	„	onduidelijk		
+	+++	+	„	aanwezig		
+	+++	+	„	afwezig		
+	+++	+	„	aanwezig	lever g.b. nier g.b. milt g.b. long g.b.	fraaie tumorgroei om excentrisch gelegen holte
+	+++	+	afwezig	afwezig		
+	+++	+	intact	aanwezig		fraaie holte, voor 't grootste deel met tumorweefsel om-groeid
+	+++	+	„	aanwezig		centraal gelegen holte, geheel omgroeid met tumor

B. RESULTATEN COLIGROEP

Sectie

Diernr. en geslacht	Tumor-groei	Tumor-gewicht in gr.	Ontste-kings-versch.	Ulceratie	Sectie bevindingen	Opmerkingen
♀ 1	—	0,5	+	+	g.b.	huiddefect bijna geheel gereëpithe-liseerd; nog klein granulerend defectje
♀ 2	—	0,5	±	—	„	geheel gereëpitheliseerd huiddefect
♀ 3	—	0,5	+	+	„	goed granulerend huiddefect met in omgeving reëpithelisatie
♀ 4	+	1,2	±	—	„	geen huiddefect zichtbaar
♂ 5	+	0,8	++	++	„	fraaie reëpithelisatie; nog een droog defectje zichtbaar
♂ 6	++	6,7	+	—	„	geheel gereëpitheliseerd huiddefect
♂ 7	—	0,8	++	++	„	exsudaat onder necrotische huidlap; perforatie-opening zichtbaar
♂ 8	+	2,2	±	—	„	geheel gereëpitheliseerd huiddefect
♂ 9	—	0,9	+++	++	„	pus onder grote necrotische huid-lap; geen absces
♂ 10	+	1,1	+	+	„	droog, goed granulerend huid-defect, met in omgeving reëpithelisatie
♂ 11	±	1,0	+	+	„	als no. 10
♂ 12	+	3,4	±	—	cyste in re. nier	geheel gereëpitheliseerd huiddefect
♂ 13	—	0,7	++	++	g.b.	reëpithelisatie en iets nattend defect
♂ 14	—	0,1	—	—	„	geen huiddefect zichtbaar
♂ 15	—	0,1	++	+	„	nog wat pus onder huiddefect zichtbaar
♂ 16	+	1,2	+	+	onder de darmserosa bleke plaques	droog defect met reëpithelisatie; plaques op dunne darm histo-logisch: lympheweefsel
♂ 17	+	0,4	+	+	g.b.	droog defect met reëpithelisatie
♂ 18	+	1,5	+	+	„	als no. 17
♂ 19	±	0,2	+	+	„	als no. 17
♂ 20	±	0,3	+	+	„	als no. 17

Histologie

Tumor-groei	Graad v. necrose in tumor	Infiltr. buiten de tumor	Epidermis in onderzochte coupes	Holtevorming in onder-zochte coupes	Onderzochte organen	Opmerkingen
—		+++	defect exsudaat reëpithelisatie	rest aanwezig		het beeld wordt beheerst door macrophagen
—		++	exsudaat reëpithelisatie	zeer kleine rest		
—		+++	defect exsudaat reëpithelisatie	afwezig		nog zeer actieve ontstekings-verschijnselen
+	++	+	intact voor zover te beoordelen	afwezig	lever g.b. milt g.b. nier g.b. long: enige ontst. haard-jes	
+	++	++	ulceratie van de tumor	afwezig		tumor ulcereert; geen reëpithelisatie
+	+++	+	intact	afwezig		
—		+++	defect exsudaat reëpithelisatie	afwezig		mogelijk nog resten van necrotisch tumorweefsel aanwezig
+	++	+++	defect exsudaat reëpithelisatie	onduidelijk		
—		++	defect exsudaat reëpithelisatie	afwezig		geen vitaal tumorweefsel aanwezig
—		+++	defect exsudaat reëpithelisatie	afwezig	long g.b. nier g.b. lever g.b. milt g.b.	
—		+++	defect	afwezig		geen duidelijke reëpithelisatie
+	++	++	intact	rest aanwezig		tumorweefsel in rand van geoblitereerde holte
—		+++	defect exsudaat reëpithelisatie	afwezig		
+	+	+++	afwezig	afwezig		
—		+++	defect exsudaat reëpithelisatie	rest aanwezig	long g.b. lever g.b. milt g.b. nier g.b.	fraai geoblitereerde restholte waarin een epidermiscyste
+	++	+++	defect exsudaat reëpithelisatie	rest aanwezig	lever g.b. milt g.b. nier: zie onder opm. long: idem	in de nier enig ontstekings-infiltraat gelocaliseerd om de bloedvaten; in long enkele broncho-pneumonische haardjes
+	++	++	defect exsudaat reëpithelisatie	rest aanwezig		fraaie, met tumor „besmet-te", ten dele geoblitereerde holte
+	++	++	defect exsudaat reëpithelisatie	afwezig		
—		++	exsudaat reëpithelisatie	rest aanwezig	long g.b. lever g.b. milt g.b. nier g.b.	vrijwel geheel geoblitereerde holte; mogelijk groepje necro-biotische tumorcellen
+	+	+++	intact	afwezig		

C. RESULTATEN STREPTOGROEP

Sectie

Diernr. en geslacht	Tumor-groei	Tumor-gewicht in gr.	Ontste-kings-versch.	Ulceratie	Sectie bevindingen	Opmerkingen
♀ 1	—	0,7	+	—	g.b.	geen huiddefect zichtbaar
♀ 2	+	1,3	±	—	„	geheel gereëpitheliseerd huiddefec
♀ 3	—	0,2	+	+	„	nog zeer klein defect; verder gereëpitheliseerd
♀ 4	+	2,0	+	+	„	als no. 3
♀ 5	±	0,3	+	—	„	geheel gereëpitheliseerd huiddefec
♀ 6	+	0,5	+	+	„	nog zeer klein defect; verder gereëpitheliseerd
♀ 7	+	1,3	—	—	„	geen huiddefect zichtbaar
♀ 8	—	0,2	+	—	„	geheel gereëpitheliseerd huiddefect
♀ 9	+	3,3	±	—	„	geen huiddefect zichtbaar
♀ 10	+	0,6	+	—	„	geheel gereëpitheliseerd huiddefect
♂ 11	—	1,3	+++	++	„	losliggende, necrotische huidlap met zeer groot ulcus
♂ 12	+	1,2	+	+	„	een klein, droog defect; verder gereëpitheliseerd
♂ 13	+	0,3	+	+	„	als no. 12
♂ 14	+	2,9	+	+	„	als no. 12
♂ 15	—	0,3	+	+	„	als no. 12
♂ 16	±	0,6	+	+	„	als no. 12
♂ 17	+	0,8	++	++	„	enigszins nattend huiddefect met goede reëpithelisatie in de omgeving
♂ 18	—	0,6	±	—	„	geheel gereëpitheliseerd
♂ 19	+	3,6	+	+	„	klein, droog defect; verder gereëpitheliseerd
♂ 20	+	2,0	+	+	„	droog, diep defect, zonder duidelijke reëpithelisatie

Histologie

Tumor-groei	Graad v. necrose in tumor	Infiltr. buiten de tumor	Epidermis in onderzochte coupes	Holtevorming in onderzochte coupes	Onderzochte organen	Opmerkingen
—		+++	intact	rest aanwezig		necrotisch materiaal (tumorweefsel?) in fraaie restholte
+	++	+++	ulcus	rest aanwezig		geoblitereerde holte
—		++	defect exsudaat reëpithelisatie	afwezig		
+	++	+	intact	onduidelijk	long g.b. milt g.b. nier g.b. lever g.b.	
—		++	defect exsudaat reëpithelisatie	rest aanwezig		epidermis in de restholte aanwezig
+	++	++	reëpithelisatie	afwezig		
+	++	+++	intact	rest aanwezig	lever g.b. long g.b. milt g.b. nier g.b.	
+	++	+	defect exsudaat reëpithelisatie	rest aanwezig		
+	+	++	intact	afwezig		
+	++	+	intact	onduidelijk		
—		+++	defect exsudaat reëpithelisatie	afwezig		
+	++	+	intact	afwezig		
—		+	defect exsudaat reëpithelisatie	afwezig	lever g.b. long g.b. milt g.b. nier g.b.	
+	++	++	defect exsudaat reëpithelisatie	afwezig		
+	+	+++	defect exsudaat reëpithelisatie	rest aanwezig		de tumormassa is aan één zijde van de holte gelegen
+	+	+++	defect reëpithelisatie	afwezig		
+	++	++	reëpithelisatie	onduidelijk	long g.b. lever g.b. milt g.b. nier g.b.	de tumor is doorgewoekerd tot in het huiddefect
—		+++	exsudaat reëpithelisatie	afwezig		
+	++	+	reëpithelisatie	afwezig	long g.b. lever g.b. milt g.b. nier g.b.	
+	+++	+++	intact	rest aanwezig		restholte vrijwel geheel geoblitereerd

eveneens gewogen; elk preparaat werd bewaard voor histologisch onderzoek. Bovendien werd van ieder 4e dier van elke groep de lever, nier, long en milt bewaard voor histologisch onderzoek. Voorts werd een deel van de tumor van elk 4e dier voor histochemisch onderzoek bestemd.

Ook als bij de sectie afwijkingen aan het licht kwamen, werd hiervan histologisch onderzoek verricht.

De resultaten van het experiment zijn overzichtelijk weergegeven in de vorenstaande tabellen

Ad A

Alle dieren van de controlegroep hadden een duidelijk waarneembare tumorgroei. (Foto 11) Slechts éénmaal werd bij de sectie duidelijke ulceratie van de huid boven de tumor waargenomen. Alle muizen hadden grote milten, overigens zonder zichtbare afwijkingen. Deze hyperplastische milten, die gewoonlijk 2 à 3 maal vergroot zijn, komen bij tumordragende dieren van de gebruikte muizenstam veelvuldig voor. In één geval werden plaques onder de serosa van de dunne darm gezien; deze bleken bij histologisch onderzoek uit lympheweefsel te bestaan.

De tumorgroei kon in alle gevallen histologisch bevestigd worden. Het beeld was geheel analoog aan dat van de beschreven mammatumor 8013 b. Tengevolge van de necrose vertoont dit gezwel om de necrosehaarden veel cellig infiltraat, wat bij onze proeven een quantitatieve beoordeling van het infiltraat, dat rondom de tumor gelegen was in elk der drie groepen, sterk bemoeilijkte. Het was bij de controledieren in het algemeen in matige hoeveelheid aanwezig.

Tekenen van metastasering elders waren niet aanwezig. De onderzochte inwendige organen vertoonden geen afwijkingen; slechts éénmaal werd een wat gestuwde lever gezien.

Eénmaal was een epidermisdefect aanwezig, bedekt met een exsudatieve korst. Dit werd aangetroffen bij het dier, waarbij ook bij de sectie een ulcus gezien werd; de tumor was hier doorgegroeid in de huid. In alle andere gevallen werd geen ulceratie waargenomen, hoewel de huid boven de tumor wel vaak atrophisch was.

Bij 12 muizen werd duidelijke holtevorming gezien met weinig tekenen van actieve ontsteking in de omgeving. Deze holte is zonder twijfel ontstaan door het ingespoten mengsel van gelei, bouillon en tumorcelsuspensie. De wand was fraai laagsgewijze opgebouwd, op dezelfde wijze als reeds werd beschreven. In een aantal gevallen werden in de wand kleine nestjes van tumorcellen waargenomen; meestal echter was het grootste deel van de holte begrensd door een dichte massa tumorweefsel. Men krijgt de indruk, dat de tumorcellen in de wand van de holte zijn geïmplanteerd en, afhankelijk van meer of minder gunstige omstandigheden, meer of minder sterk zijn uitgegroeid, zodat in het meest extreme geval de gehele

holte is ingesloten in tumorweefsel. Drie maal werd de holte niet waargenomen in de onderzochte coupes en driemaal was de holtevorming dubieus (Foto 13 en 14).

Histochemisch onderzoek van de tumor leverde eenzelfde enzympatroon op als bij de donortumor en de tumor gegroeid bij coli- en streptogroep (Foto 10).

Ad B

Van 9 muizen uit de coligroep werd bij de sectie aangenomen, dat er tumorgroei aanwezig was; bij 8 dieren werd deze niet gezien en in 3 gevallen was de tumorgroei dubieus (Foto 12).

Bij microscopisch onderzoek is in 10 gevallen tumorgroei waargenomen. Eénmaal bleek bij de sectie ten onrechte verondersteld te zijn, dat tumorweefsel aanwezig was, en éénmaal bleek een muis, waarvan werd aangenomen, dat deze geen tumorgroei had, toch een zeer kleine tumor te hebben. De drie dubieuze gevallen bleken 2 maal negatief en 1 maal positief te zijn. Er is dus een goede correlatie tussen hetgeen bij de sectie werd vermoed en wat bij histologisch onderzoek werd gevonden. Bij 14 van de 20 dieren werd nog een huiddefect gezien tengevolge van ulceratie; in de resterende 6 gevallen was 4 maal een duidelijke reëpithelisatie zichtbaar, terwijl slechts 2 maal in het geheel geen afwijkingen van de huid werden gezien, zodat hier niet met zekerheid kon worden uitgemaakt, of er abscedering en vervolgens een doorbraak had plaats gevonden. Ook bij histologisch onderzoek was er in de laatste 2 gevallen geen afwijking van de huid zichtbaar. De sectie leverde ook hier verder weinig op; éénmaal werd een cyste in een nier gezien en éénmaal waren plaques onder de serosa van de dunne darm aanwezig, die bij histologisch onderzoek uit lympheweefsel bleken te bestaan. Alle milten waren duidelijk vergroot, evenals in de controlegroep.

Indien het niet mogelijk was tumorweefsel aan te tonen in enige coupes van het uitgesneden weefselstukje, werden de preparaten in hun geheel op serie gesneden en weer beoordeeld. Bij deze groep werd op deze wijze nog één tumortje ontdekt.

De bouw van de tumor, voorzover die aanwezig was, verschilde niet van het normale tumorbeeld. Het infiltraat in de onmiddellijke omgeving van de tumor bood het beeld van een ontsteking, die over het hoogtepunt heen is; er waren slechts quantitatieve verschillen met de controlegroep aanwezig, in die zin, dat het infiltraat bij de coligroep in het algemeen iets celrijker was en vaak ook meer macrophagen bevatte. Op grond van het infiltraat was echter niet te zeggen, tot welke groep het dier had behoord.

De epidermis vertoonde vaak tekenen van ernstige beschadiging. Herhaaldelijk werden ook gebieden van reëpithelisatie waargenomen; hier ontbraken de haarfollikels.

Metastasering op afstand werd niet gezien; ook ontbraken duidelijke metastatische abscessen. Slechts enige malen werden kleine ontstekingshaardjes in de long gevonden bij histologisch onderzoek, en éénmaal waren er enkele gebieden van ontstekingsinfiltraat in de nier te zien. Overigens werden er in de onderzochte inwendige organen geen ontstekingshaarden gezien. Een rest van een holte was nog 7 maal aanwezig. Deze holte was veel minder fraai begrensd dan die bij de controlegroep; er was in het algemeen veel meer cellig infiltraat in de omgeving, met meestal veel macrophagen. De holtes waren ten dele geoblitereerd, en men kreeg de indruk, dat ze meer excentrisch ten opzichte van de tumor gelegen waren. Dit is te verklaren door aan te nemen, dat er een doorbraak naar buiten is geweest; zo er al tumorgroei is opgetreden, zal deze vooral aan de onderzijde van de holte tot ontwikkeling zijn gekomen. Door ontstekingsinfiltraat is het restant van de leeggelopen holte ten dele opgevuld geworden (Foto 15).

Ad C:

Bij de sectie werd aangenomen, dat 12 muizen tumorgroei vertoonden, 6 maal werd geen groei gezien en 2 maal was deze dubieus (Foto 16). Na histologisch onderzoek (eveneens zonodig van seriecoupes) bleken 14 dieren tumorgroei te hebben en 6 niet. Het macroscopisch onderzoek had tweemaal een fout negatieve- en éénmaal een fout positieve diagnose opgeleverd. Eén der beide dubieuze gevallen was negatief en één bleek positief te zijn. Ook hier was dus een redelijk goede correlatie aanwezig.

In 12 gevallen bleek er een duidelijk huiddefect tengevolge van ulceratie aanwezig te zijn, vijfmaal was er alleen reëpithelisatie zichtbaar, en driemaal kon niet worden aangetoond, dat er abscedering met doorbraak had plaats gevonden. Ook bij het histologisch onderzoek werd geen afwijking aan de epidermis waargenomen in deze gevallen.

De verschillen met de coligroep zijn niet evident, hoewel de indruk verkregen werd, dat het genezingsproces in de streptogroep iets verder was voortgeschreden. Slechts bij 1 dier werd geen duidelijke neiging tot genezing van het huiddefect gezien.

Verder werd bij de sectie niets van belang waargenomen. Ook hier waren de milten van alle dieren vergroot.

Voor het histologisch onderzoek geldt hetzelfde als reeds is vermeld bij de coligroep. Eénmaal werd een iets gestuwde lever gezien. Ontstekingshaarden werden niet waargenomen in de onderzochte inwendige organen. Resten van een holte, onder de huid gelegen, werden in 7 gevallen waargenomen.

Discussie

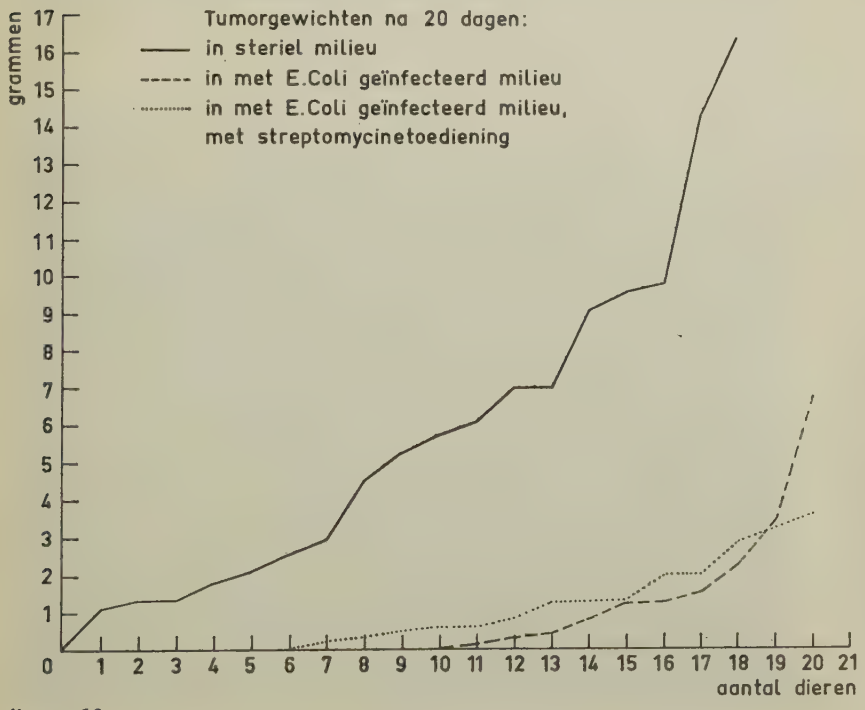
Bij een vergelijking van de gegevens, verzameld bij dit experiment, valt

op, dat er geen duidelijk verschil aanwezig is tussen de coli- en de streptogroep. De invloed van het streptomycine is gering geweest, zoals op grond van theoretische overwegingen en de ervaring in de kliniek (waar een absces niet tot genezing komt door de toediening van antibiotica alleen) ook te verwachten was.

Er was geen duidelijk verschil tussen de beide groepen wat het aantal gevallen betreft waarin abscesvorming met doorbraak was opgetreden; mogelijk vertoonden de actieve ontstekingsverschijnselen bij de dieren van de streptogroep een iets snellere regressie dan die in de coligroep.

Op het tijdstip, waarop de proef werd beëindigd, bleek de ontsteking reeds over haar hoogtepunt te zijn. Dit wijst er op, dat de dieren niet aan hun abscessen te gronde zouden zijn gegaan.

Het gemiddelde gewicht der tumormassa van de dieren uit de controlegroep, bedroeg 6,0 gram, dat uit de coli- en de streptogroep ieder 1,2 gram. Bij statistische analyse van de tumormassa, gevormd in elk der drie groepen (toets van WILCOXON), blijkt er een zeer significant verschil te bestaan tussen enerzijds de sterkte van de tumorgroei in de controlegroep en anderzijds die in de coli- en streptogroep ($P < 0{,}0001$). De beide laatste groepen vertonen onderling geen verschil.



figuur 10

In figuur 10 zijn de tumorgewichten van de drie groepen, in opklimmende reeks gerangschikt, weergegeven. Tevens is in deze figuur aangegeven het aantal gevallen, waarin geen tumorgroei is opgetreden. Dit blijkt in de coligroep 10 te zijn en in de streptogroep 6, terwijl er in de controlegroep steeds tumorgroei optrad. Berekend met de χ^2 toets, blijkt er een significant verschil te bestaan tussen controlegroep en coligroep ($P = 0{,}001$) en tussen controlegroep en streptogroep ($P = 0{,}017$). Daarentegen kan een dergelijk statistisch significant verschil niet worden aangetoond tussen coligroep en streptogroep onderling ($P = 0{,}20$).

Indien er een bacteriële infectie in het spel is, wordt dus in een aanzienlijk kleiner aantal gevallen tumorgroei na een inoculatie waargenomen. Treedt er toch tumorgroei op, dan is de gevormde tumormassa kleiner dan bij een vergelijkbare controlegroep. In het eerste geval zullen alle ingebrachte cellen te gronde gaan, eventueel na een begin van uitgroei. In het andere geval zal er een aantal, dat kleiner is dan in de controlegroep dankzij de ontsteking, tot uitgroei zijn gekomen; men kan zich echter voorstellen, dat deze tumoren, nadat de ontsteking was genezen, de dieren tenslotte toch zouden hebben gedood.

Het is, gezien de histologische en histochemische beelden die geheel identiek zijn met die van de tumoren uit de controlegroep, onwaarschijnlijk, dat er tengevolge van het ontstekingsproces een wezenlijke verandering van de tumor heeft plaats gevonden.

Uit deze experimenten kan geconcludeerd worden, dat onder de gegeven proefomstandigheden een ingebrachte tumorcelsuspensie meer kans heeft op aanslaan en uitgroei in een steriel milieu, ook al is daar in zekere mate een steriele ontsteking bij, dan in een milieu, dat sterk met E. coli is verontreinigd.

Foto 9

Subcutaan absces, 10 dagen na het inbrengen van een E. coli cultuur

Foto 10

Experimentele mammatumor van de muis 120 ×
Histochemische enzymreactie op alcalische phosphatase; weefsel met enzymactiviteit is op de foto zwart weergegeven

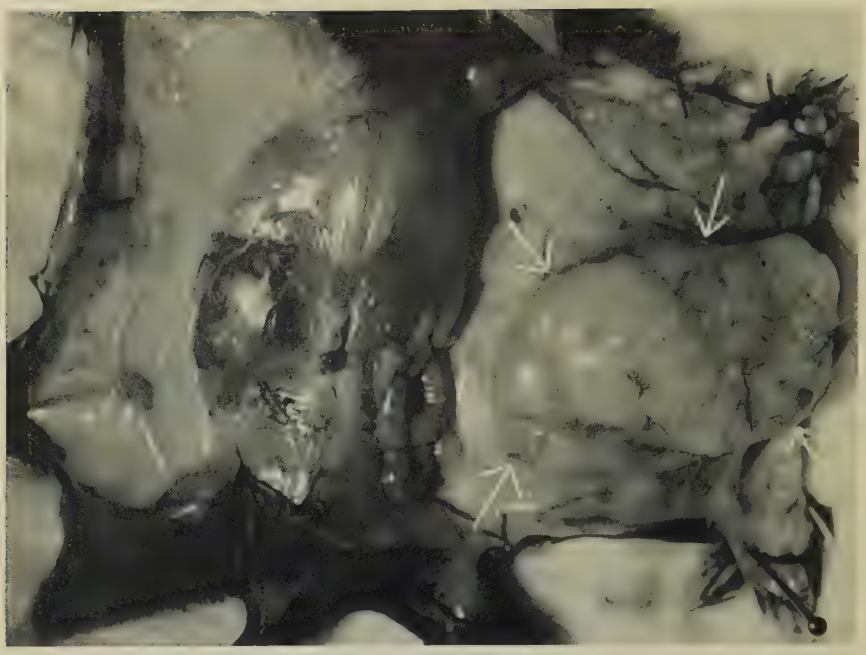


Foto 11

Controlemuis, 20 dagen na subcutane inoculatie
Tumorgewicht 9,1 gr.

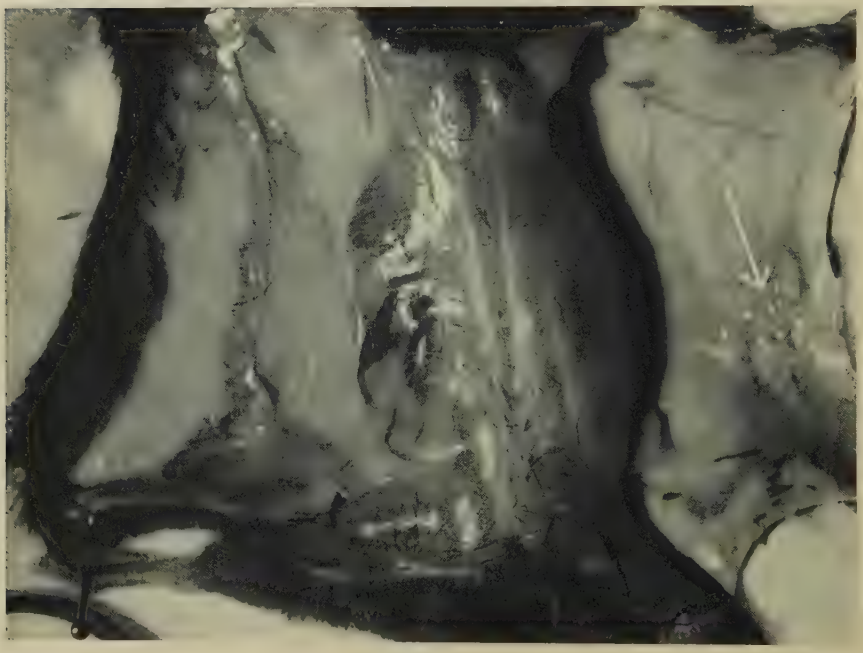


Foto 12

Muis uit de coligroep, 20 dagen na subcutane inoculatie
Rest van het infiltraat zichtbaar. Geen tumorgroei

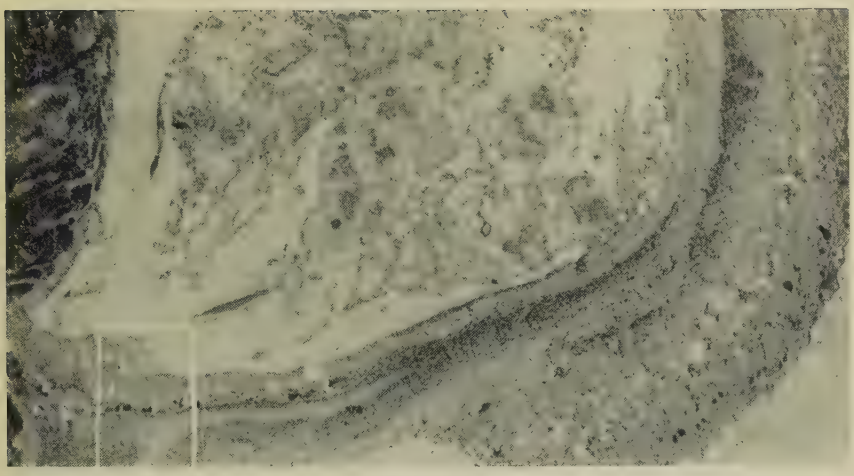


Foto 13

Subcutane holte bij controlemuis 15 × H.E.
Links in het beeld wordt de holte begrensd door tumorweefsel; links onder kleine tumorcelnestjes zichtbaar

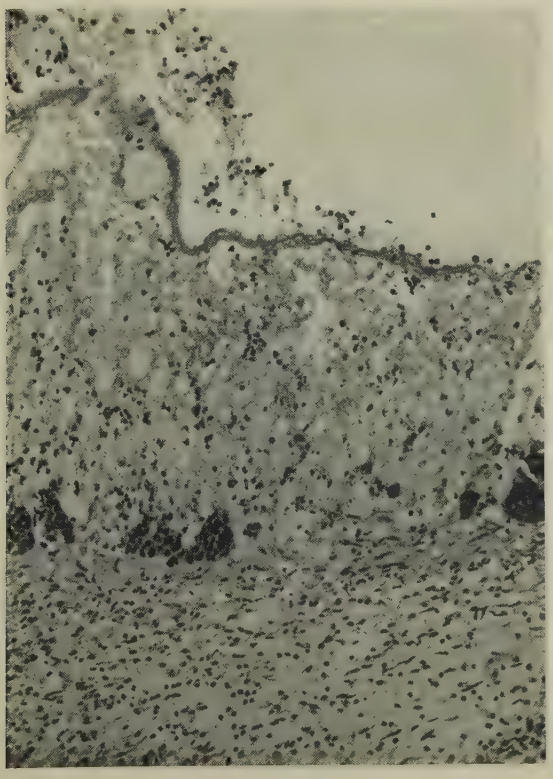


Foto 14

Tumor-implantatie op holtewand 120 × H.E.
Vergroting van het aangegeven deel van foto 13; boven de tumorcellen is een fibrinelaag gelegen, waarin zich leucocyten bevinden

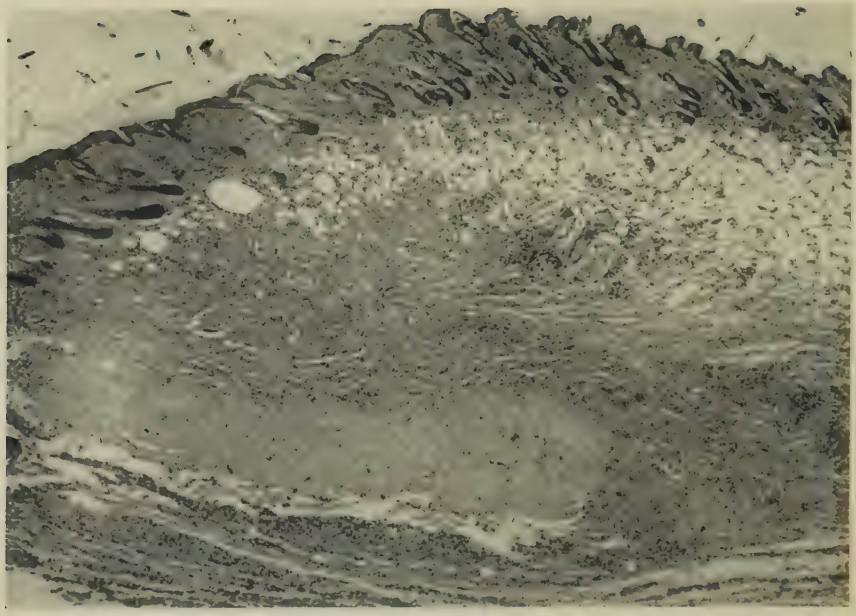


Foto 15

Subcutane holte bij muis uit de coligroep 30 × H.E.
Holte geobliteerd; in het centrum necrotisch materiaal.
Geen tumorweefsel aanwezig

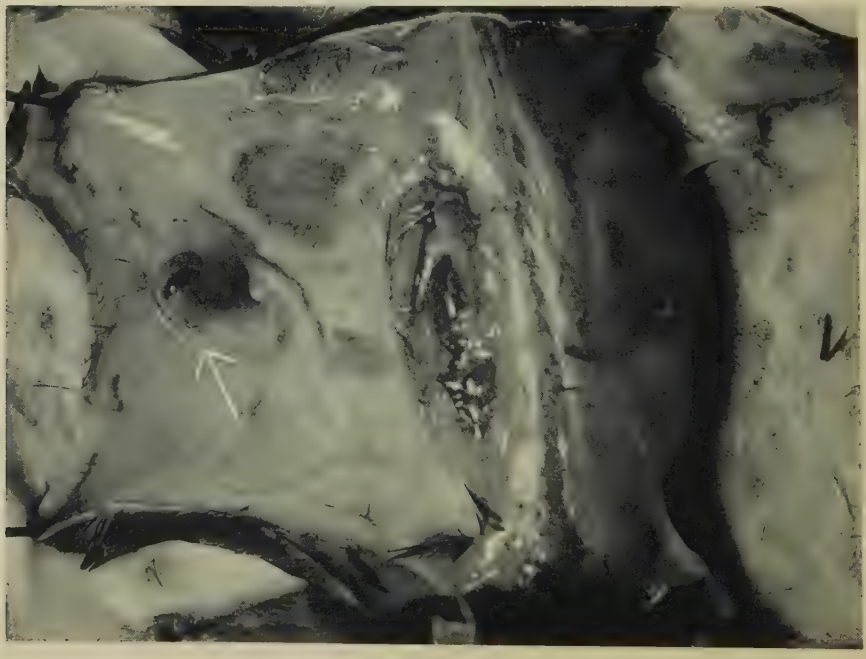


Foto 16

Muis uit de streptogroep, 20 dagen na subcutane inoculatie
Tumorgewicht 0,3 gr.

SAMENVATTING EN CONCLUSIES

Uitzaaiing van een kwaadaardig gezwel kan plaats vinden via de bloedbaan, het lymphestelsel, of door directe nesteling van losse tumorcellen of tumorbrokjes op met mesotheel beklede oppervlakten. Deze laatste wijze van metastasering, implantatiemetastasering genoemd, kan ook oorzaak zijn van een recidief indien na een overigens radicale operatie, tumorcellen achterblijven in het operatieterrein en hier tot uitgroei komen. Door deze implantatiemetastasen te voorkomen, kan het aantal gevallen van onverwacht locaal recidief misschien verminderd worden.

Een groot aantal waarnemingen wijst erop, dat juist tengevolge van een operatieve ingreep, levenskrachtige tumorcellen loslaten en in wondbed of anastomose achterblijven en tot uitgroei kunnen komen.

Een aantal maatregelen zijn in de loop der jaren voorgesteld om de kans hierop zo klein mogelijk te maken. Deze maatregelen zijn, voorzover mogelijk:

1. uitsnijden van het gezwel in toto, tot ver in het gezonde weefsel.
2. gebruik maken van het electrische mes.
3. zo weinig mogelijk manipuleren met de tumor, zowel vóór als tijdens de operatie.
4. excisie-biopsieën verrichten en geen incisie-biopsieën.
5. operatiegebied afdammen met gazen en na de operatie het terrein ruim uitspoelen met physiologisch zout.
6. spoelen van het operatieterrein met celdodende vloeistoffen, o.a. sublimaat 0,2% en formaldehyde 0,1%.
7. hechtmateriaal impregneren met celdodende vloeistoffen, o.a. picrinezuur 7,3%.
8. bij darmtumoren het lumen aan weerszijden van de tumor zo snel mogelijk afsluiten en de resectie buiten deze afsluiting verrichten.
9. bij darmtumoren met doorgroei in de serosa, de tumor aan de serosazijde afdekken.
10. zo snel mogelijk onderbinden van de belangrijkste vaten die het tumorgebied draineren.
11. kankerchemotherapeutica toedienen, zowel locaal als parenteraal.

Niet alleen moet men maatregelen nemen om contaminatie van het operatieterrein met kankercellen te voorkomen, maar men dient zich ook

af te vragen of de uitgroei van achtergebleven tumorcellen mogelijk wordt bevorderd door de toepassing van moderne chirurgische methoden.

Uit experimenteel onderzoek is gebleken, dat prae-operatieve darmdesinfectie het aanslaan en de uitgroei van tumorcellen gunstig beïnvloedt. Aangezien het grote voordeel van deze prae-operatieve darmbehandeling niet prijsgegeven dient te worden, is het juist bij kankeroperaties van de tractus digestivus van groot belang om te voorkomen, dat levende kankercellen in het operatieterrein achterblijven.

Kankerchemotherapeutica kunnen van grote waarde zijn bij het onschadelijk maken van kleine hoeveelheden kankerweefsel. Een korte samenvatting van de belangrijkste kankerchemotherapeutica werd gegeven, waarbij vooral aandacht is besteed aan stikstofmosterd, triaethyleen-thiophosphor-amide en phenyl-alanine-mosterd. Doseringen en toedieningswijzen werden vermeld, evenals de bijwerkingen, die de oorzaak zijn van de geringe therapeutische breedte van deze stoffen.

Bij proefdieren zijn een groot aantal onderzoekingen verricht omtrent de werking van kankerchemotherapeutica op tumorcellen. Hierbij is vastgesteld, dat de kans op uitgroei van ingebrachte tumorcellen aanmerkelijk kleiner wordt, indien chemotherapeutica worden toegediend. Zelfs kunnen kleine tumoren tot verdwijnen gebracht worden als voldoende van de stof wordt gegeven. Er blijkt een omgekeerde evenredigheid te bestaan tussen de werking van het ingebrachte kankerchemotherapeuticum en het aantal aanwezige, levende tumorcellen, zodat een slechter resultaat bereikt wordt naarmate de tumor groter is.

Voorts blijken de nog niet genestelde cellen gevoeliger te zijn, dan cellen die reeds geïmplanteerd zijn; toediening in de eerste 48 uur na de tumorcelbesmetting, geeft dan ook de beste resultaten.

Ook in de kliniek worden kankerchemotherapeutica reeds gebruikt voor het tegengaan van recidieven na chirurgisch „curatieve" ingrepen. Definitieve resultaten zijn nog niet bekend. Doseringsschema's voor het gebruik als adjuvans bij kankeroperaties werden vermeld. Gezien het belang van de prophylaxe der entmetastasering, hebben wij dit probleem experimenteel bestudeerd, waarbij de doelstelling was:

a. *na te gaan, of implantatiemetastasering op het peritoneum kan worden tegengegaan, indien korte tijd na een intraperitoneale inoculatie met kankercellen een kankerchemotherapeuticum wordt toegediend.*

b. *te onderzoeken, of de uitgroei tot tumoren van subcutaan ingebrachte tumorcellen wordt beïnvloed door een gelijktijdige infectie met E. coli van het milieu waar de enting plaats vindt.*

In deze experimenten werd gebruik gemaakt van muizen van de zuivere stam C_{57} black of de eerste bastaardgeneratie van $♀ C_{57\,bl.} \times ♂ O_{20}$ (F_1 muizen). Als experimentele tumor werd een adenocarcinoma mammae (8013b)

gebruikt, dat bij deze muizen zeer gemakkelijk overentbaar is. De dieren van de controle- en de behandelde groepen werden steeds aselect gekozen.

Eerste reeks experimenten

Het bleek, dat een suspensie van losse tumorcellen en kleine brokjes van hoogstens 10 cellen intraperitoneaal ingespoten, een zeer goede groei op het gehele peritoneum te zien gaf, die een sterk gedissemineerd karakter had. Tengevolge van deze locale tumorgroei gingen de proefdieren 10—15 dagen na de inoculatie te gronde.

Hierna werd een serie van 13 F_1 muizen percutaan intraperitoneaal geënt met een tumorcelsuspensie. Een uur erna werd bij 6 dieren de buikholte onder narcose geopend en gedurende 3 minuten gespoeld met 10 cc physiologisch zout, waarna de buikholte gesloten werd. Bij de 7 overige dieren vond dezelfde procedure plaats, behalve dat deze gespoeld werden met 10 cc formaldehyde 0,1%. De gemiddelde overlevingstijd van de muizen uit de controlegroep bedroeg 15,1 dagen, die van de met formaldehyde behandelde dieren 23,7 dagen. Het verschil in overlevingstijd bleek statistisch significant te zijn. De tumorgroei bij de controledieren was zeer gedissemineerd, die van de behandelde dieren daarentegen veel meer gelocaliseerd.

Bij een tweede proefopstelling werden 36 $C_{57\ bl.}$ muizen intraperitoneaal met tumorcellen ingespoten. De helft van de dieren kreeg één uur later percutaan intraperitoneaal 1 mg/kg l.g. TSPA toegediend. Dit werd herhaald na 24 en na 48 uur, waarbij telkens 0,5 mg/kg l.g. TSPA werd ingespoten. De andere helft kreeg even vaak physiologisch zout toegediend, en diende als controlegroep. De gemiddelde overlevingstijd der behandelde dieren bedroeg 14,0 dagen, die van de onbehandelde muizen 16,2 dagen. Het verschil in overlevingstijd was niet significant. Er was geen verschil in tumorgroeipatroon op te merken tussen de beide groepen: deze was steeds van zeer diffuus karakter.

Een soortgelijke proefneming werd bij 40 $C_{57\ bl.}$ muizen verricht met l-phenyl-alanine-mosterd (Melphalan), een stof die evenals TSPA tot de radiomimetica behoort. Een uur na de intraperitoneale enting met tumorcellen kreeg de helft van de dieren 4 mg/kg l.g. Melphalan percutaan intraperitoneaal ingespoten. De andere helft kreeg slechts het oplosmiddel toegediend. De gemiddelde overlevingstijd der behandelde dieren bedroeg nu 36,9 dagen, die der controle dieren 12,4 dagen. Het verschil bleek zeer significant te zijn. Bij een herhaling van dit experiment met 28 $C_{57\ bl.}$ muizen bedroegen de overlevingstijden resp. 33,4 dagen en 14,0 dagen, eveneens een significant verschil. Het tumorgroeipatroon bij de behandelde dieren was geheel analoog aan dat van de met formaldehyde 0,1% behandelde muizen.

Voorts kon aangetoond worden, dat bij de behandelde muizen in eenzelfde tijdsbeloop minder gezwelmassa werd gevormd dan bij de onbe-

handelde dieren. De oorzaak hiervan bleek niet gezocht te moeten worden in een vertraagde groei van de ingebrachte kankercellen bij de behandelde dieren, maar in een kleiner hoeveelheid tumorweefsel bij de aanvang van de groei, doordat een groot aantal van de ingebrachte cellen tengevolge van het chemotherapeuticum direct onschadelijk werd gemaakt. Dit verklaart eveneens het minder gedissemineerde groeipatroon, wat mogelijk ook de overlevingstijd gunstig heeft beïnvloed.

Histologisch en histochemisch konden geen verschillen worden waargenomen tussen tumor, lever, milt, nier, long, dikke darm en dunne darm van niet- en wel behandelde dieren. Haematogene- en lymphogene uitzaaiing werd niet aangetoond.

Vastgesteld werd een voorkeur van de tumorcellen om te implanteren op de plaatsen waar het peritoneum was doorboord; in alle gevallen trad hier tumorgroei op.

Tweede reeks experimenten

Bij een tweede serie proeven, werd na een aantal voorbereidende experimenten uitgegaan van 66 F_1 muizen, die aselect in drie groepen werden verdeeld. Eén groep werd subcutaan geïnoculeerd met een mengsel van 0,5 cc tumorcelsuspensie, 0,5 cc 24 uur oude bouilloncultuur van E. coli die tevoren uit de faeces was gekweekt, en 1 cc gelei om de ontsteking te localiseren (coli-groep).

Een tweede groep onderging dezelfde behandeling, maar kreeg bovendien de dag vóór de inoculatie en de drie volgende dagen 40 mg/kg l.g. streptomycine i.d. ingespoten (strepto groep). De derde groep kreeg subcutaan een mengsel van 0,5 cc steriele bouillon, 0,5 cc tumorcelsuspensie en 1 cc gelei toegediend (controle groep).

Bij vrijwel alle dieren uit de coli- en streptogroep traden na enige dagen abscessen op, die bij het beëindigen van de proef op de 20e dag, geheel genezen waren, of sterke neiging tot genezing vertoonden.

Nadat de dieren gelijktijdig waren afgemaakt, vond sectie plaats. De aanwezige tumormassa, inclusief ontstekingsinfiltraat, werd uitgeprepareerd en gewogen. Steeds werd het uitgeprepareerde weefsel histologisch onderzocht; indien geen tumorweefsel werd aangetroffen, werden seriecoupes vervaardigd. Van elk vierde dier werd voorts lever, long, milt en nier onderzocht, waarbij geen afwijkingen gevonden werden. Het histochemisch onderzoek der tumoren leverde geen verschillen op met de oorspronkelijke tumor.

Voor beoordeling waren 18 controledieren, 20 muizen van de coligroep en 20 van de streptogroep geschikt. Alle muizen van de controlegroep vertoonden tumorgroei. Het gemiddelde tumorgewicht bedroeg 6,0 gram. Van de coligroep vertoonden 10 dieren tumorgroei, met een gemiddelde gewicht van de tumor van 1,2 gram, en van de streptogroep waren er 14 muizen met tumorgroei, gemiddeld tumorgewicht eveneens 1,2 gram.

Een effect van de streptomycine kon niet met zekerheid aangetoond worden, maar bij het histologisch onderzoek waren de actieve ontstekingsverschijnselen geringer dan bij de muizen uit de coligroep. Ook was er bij meer dieren tumorgroei opgetreden, dan in de coligroep. Wij hebben echter niet kunnen bewijzen, dat de streptomycine, door de ontsteking tegen te gaan, de tumorgroei bevorderde. De oorzaak hiervan moet gezocht worden in het feit, dat de abscesvorming voorkwám, dat een voldoende hoge streptomycineconcentratie bereikt werd op de plaats van de infectie. Een proefopstelling waarbij geen abscessen gevormd worden, maar alleen een ontsteking optreedt, zodat het effect van antibiotica kan worden nagegaan, is gewenst.

Conclusies

Uit de eerste serie experimenten blijkt het volgende.

Met een suspensie van losse kankercellen en kleine tumorbrokjes zijn bij de muis, na intraperitoneale inoculatie, gemakkelijk implantatiemetastasen op het peritoneum op te wekken. Deze hebben een voorkeur voor beschadigd weefsel.

Het aantal peritoneale implantatiemetastasen neemt sterk af en de overlevingstijd wordt gunstig beïnvloed, indien kort na de enting een stof wordt toegediend, waarvoor de tumorcellen gevoelig zijn.

Het feit, dat eenzelfde kwaadaardige tumor niet reageert op het ene kankerchemotherapeuticum, daarentegen wel op een ander, dat ermede verwant is, bevestigt de waarnemingen, dat *elke tumor zijn eigen gevoeligheidspatroon bezit*. Een methode die snel deze gevoeligheid kan vaststellen is nog niet voor klinisch gebruik ontwikkeld, maar is voor de ontplooiing van de toepassing der kankerchemotherapeutica noodzakelijk.

Hiernaast zal het onderzoek naar werkzamer stoffen met groter therapeutische breedte krachtig voortgezet moeten worden. Zolang deze stoffen niet beschikbaar zijn, moet gepoogd worden de techniek van de geïsoleerde doorstroming met kankerchemotherapeutica van lichaamsdelen waar een kwaadaardig gezwel gezeteld is, verder te ontwikkelen en voldoende betrouwbaar te maken voor klinisch gebruik.

Deze, bij dieren verrichte waarnemingen zal men niet kritiekloos mogen overbrengen naar de kliniek. Toch menen wij, dat deze proeven een sterke aanwijzing zijn, dat het aantal gevallen van implantatiemetastasering en daarmede van onverwacht recidief, aanzienlijk zal afnemen als tijdens en vlak na de operatie gebruik wordt gemaakt van een chemotherapeuticum waarvoor de tumor gevoelig is, waardoor de uitgroei van in het operatieterrein geraakte tumorcellen wordt belemmerd. De overige reeds genoemde prophylactische maatregelen mogen hierbij echter niet verwaarloosd worden.

Uit de tweede proefopstelling is gebleken, dat de kans op uitgroei van

kankercellen, ingebracht in een steriel milieu, groter is dan bij inbrenging in een met E. coli geïnfecteerd milieu.

Aangezien bij kankeroperaties van de darm deze veelal prae-operatief wordt gedesinfecteerd, zal het milieu waarin de achtergebleven tumorcel terechtkomt, minder kans hebben met bacteriën te worden gecontamineerd, dan vóór de toepassing van de darmdesinfectie het geval was. Met de nodige reserve kan op grond van deze experimenten worden aangenomen, dat de kans op uitgroei groter is geworden sinds de darmdesinfectie wordt toegepast. Nog meer dan vroeger zal voorkómen moeten worden dat er tumorcellen in het operatiegebied geraken en met name geldt dit voor de anastomose. Mocht een „aseptische" werkwijze onmogelijk zijn, dan moeten voor de „antisepsis" kankerchemotherapeutica worden gebruikt.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

Dissemination of a malignant tumour may be effected by the blood stream, the lymphatic system or by direct implantation of loose tumour cells or fragments of tumour on surfaces lined with mesothelium. The last-named form of metastasis, termed implantation metastasis, may also give rise to recurrences when tumour cells are left in the operative field and start to grow in this area following an otherwise radical operation. By preventing these implantation metastases, the incidence of unexpected local recurrences may possibly be reduced.

The study of a large number of cases suggests that a surgical procedure may be the very cause of the detachment of viable tumour cells which are left in the wound bed or anastomosis and may start to grow.

In the course of time, a number of measures have been suggested to reduce this hazard to a minimum. In so far as they are practicable, these measures are:

1. total excision of the tumour, a large portion of the normal tissue surrounding it being excised in continuity with it.
2. using the electric knife.
3. reducing manipulation of the tumour to a minimum both prior to and during operation.
4. performing biopsy by excision and not by incision.
5. isolating the operative field with gauze and extensive postoperative washing out of the area with saline.
6. washing out the operative field with cytocidal fluids such as 0,2 per cent sublimate and 0,1 per cent formaldehyde.
7. impregnation of the suture material with cytocidal fluids such as 7,3 per cent picric acid.
8. rapid occlusion of the lumen on either side of the tumour and excision outside this occlusion in case of tumours of the intestine.
9. covering of the tumour on the side of the serosa in the event of invading growth of tumours of the intestine into the serosa.
10. rapid ligation of the main vessels draining the region of the tumour.
11. local as well as parenteral administration of chemotherapeutic agents used in the treatment of cancer.

Not only should measures be adopted to prevent contamination of the operative field by cancer cells, but the question should also be asked whether the growth of cancer cells that have been left behind may possibly be promoted by the use of modern surgical procedures.

Experimental studies showed that the take and growth of tumour cells are promoted by pre-operative desinfection of the intestine. As the great advantage of this pre-operative treatment of the intestine should not be sacrificed, it is of vital importance to prevent living cancer cells from being left in the operative field, particularly in operations performed for carcinoma of the alimentary tract.

Anticarcinogenic chemicals may be very useful in destroying small quantities of cancer tissue. The main chemotherapeutic agents used in the treatment of carcinoma were briefly reviewed, special attention being paid to nitrogen mustard, triethylene-thio-phosphoramide and phenylalanine mustard. The dosage and methods of administration are discussed, as well as the side-effects which have considerably reduced the therapeutic range of these substances.

A large number of studies on the action of anticarcinogenic chemicals on tumour cells were done in animals. Administration of chemotherapeutic agents was found to reduce the likelihood of growth of tumour cells inoculated into the animals, in a remarkable way. Administration of sufficient quantities of the chemicals may even result in the disappearance of small solid tumours. The action of the chemotherapeutic agent administered was found to be inversely proportional to the number of living tumour cells present, so that the results obtained will become less satisfactory as the size of the tumour increases.

In addition, the cells which have not yet become implanted are found to be more sensitive than those which have become implanted; therefore, administration within forty-eight hours after the contamination with tumour cells will produce the most satisfactory results.

Anticarcinogenic chemicals are also clinically used to prevent recurrences following "curative" surgical procedures. Definitive results have not been reported so far. Dosage schemes for the adjunctive use of these agents in operations for cancer are stated. The problem how to prevent implantation metastasis, has been studied experimentally for the purpose of:

a. determining whether implantation metastasis on the peritoneum can be prevented by administering chemotherapeutic agents shortly after the intraperitoneal inoculation of cancer cells;

b. examining whether the development of tumours from tumour cells introduced by subcutaneous inoculation, is affected by simultaneous infection with Esch. coli of the area in which the inoculation is performed.

The experimental animals were mice of the inbreed C_{57} black strain or the first cross-breed of ♀ C_{57} × ♂ O_{20} (F_1 strain). The experimental tumour was an adenocarcinoma of the breast (8013 b) which is readily transferable to these mice. The controls and treated animals were selected at random in every case.

First series of experiments

Intraperitoneal inoculation of a suspension of loose tumour cells and small fragments consisting of less than ten cells was found to result in an extensive growth all over the peritoneum, the growth showing a markedly disseminated character. As a result of this local tumour growth, the animals used in the experiment died between ten to fifteen days after inoculation.

A suspension of tumour cells then was inoculated percutaneously into the peritoneum in a group of thirteen mice of the F_1 strain. Sixty minutes later, the abdominal cavity was opened in six anaesthetised animals and washed out with ten ml. of 0,9% saline for three minutes, after which it was closed again. This procedure was also used in the seven other animals, though now the abdominal cavity was washed out with ten ml. of 0,1 per cent formaldehyde.

The mice of the group of controls survived for an average period of 15,1 days, the animals treated with formaldehyde surviving for an average period of 23,7 days. The difference between the survival periods was found to be statistically significant. The tumour growth in the controls was widely disseminated, whereas that in the treated animals was much more localized.

In another experiment, tumour cells were inoculated intraperitoneally in thirty-six mice of the C_{57} black strain. Sixty minutes later, fifty per cent of the animals were treated with percutaneous intraperitoneal inoculation of one mgr. of TSPA per kg. body weight. This was repeated after 24 and 48 hours; in each case 0,5 mgr. of TSPA per kg body weight was inoculated. The other fifty per cent, serving as controls, were injected following the same scheme with 0,9% NaCl.

The average survival period was 14,0 days in the animals treated with TSPA and 16,2 days in the untreated mice. The difference between the periods of survival was not significant. There was no perceptible difference of tumour growth pattern between the two groups, the growth being highly diffuse in both.

A similar experiment was carried out in forty mice of the C_{57} black strain using 1-phenylalanine mustard (Melphalan), a substance which, like TSPA, is a radiomimetic agent. Sixty minutes after the intraperitoneal inoculation of tumour cells, four mgr. of Melphalan per kg. body weight were inoculated percutaneously into the peritoneal cavity of fifty per cent of the animals. Only the solvent was administered to the other fifty per cent. The average survival period was 36,9 days in the treated animals

and 12,4 days in the controls. The difference was found to be statistically highly significant. When this experiment was carried out again on twenty-eight mice of the C_{57} black strain, the survival periods were 33,4 days and 14,0 days respectively, the difference also being significant.

The tumour growth pattern in the treated animals was completely identical with that of the mice treated with 0,1 per cent formaldehyde.

In addition, the tumour mass produced in the treated animals was shown to be smaller than that developed in the untreated animals within a similar period. This was not due to a retardation of growth of the cancer cells inoculated in the treated animals, but to the fact that the amount of living tumour tissue present at the onset of growth was smaller, as a large number of the cells inoculated had been immediately destroyed by the chemotherapeutic agent. This also accounts for the less markedly disseminated growth which may also have had a beneficial effect on the survival period.

In treated and untreated animals histological and histochemical examination did not reveal any difference between the tumours, livers, spleens, kidneys, lungs, large intestines and small intestines. Dissemination by the blood stream and lymphatics was not shown to have occurred.

The tumour cells were found to show a predilection for implantation at those sites at which the peritoneum had been pierced; tumours developed at these sites in every case.

Second series of experiments

A number of preliminary experiments having been carried out, sixty-six mice of the F_1 strain arranged into three groups, selected at random, were studied in another series of experiments. One group was treated by subcutaneous inoculation with a mixture of 0,5 ml. of a suspension of tumour cells, 0,5 ml. of a twenty-four-hour-old bouillon culture of Esch. coli previously isolated from the faeces and 1 ml. of jelly to localize the inflammation (Esch. coli group).

Another group was given a similar treatment, though in this case forty mgr. of streptomycin per kg. body weight were injected daily by subcutaneous route on the day prior to inoculation with tumour cells and on the three following days (streptomycin group). The third group was treated with a mixture of 0,5 ml. of sterile bouillon, 0,5 ml. of a suspension of tumorcells and 1 ml. of jelly, injected subcutaneously (group of controls).

Within a few days, abscesses occurred in nearly all animals of the Esch. coli and streptomycin groups; when the experiment was completed twenty days later, these abscesses had disappeared entirely or showed a strong tendency to heal.

Autopsies were performed on the 20th day. The tumour mass as well as the inflammatory infiltration were dissected out and weighed. The tissue dissected out was subjected to histological examination in every case; when tumour tissue was not immediately found to be present, serial sections

were made. In addition, the liver, lung, spleen and kidney of every fourth animal were examined, which organs did not show any changes.

Histochemical examination of the tumours did not reveal any difference from the original tumour.

Eighteen controls, twenty mice of the Esch. coli group and twenty of the streptomycin group were suitable for examination. In all the controls tumours were found. The mean weight of the tumours was 6,0 grams. Of the Esch. coli group, ten animals showed growth of tumours, the mean weight of the tumours being 1,2 gr., and of the streptomycin group, fourteen mice showed tumour growth, the mean weight of the tumors also being 1,2 gr.

The effect of the streptomycin was not positively identifiable, but histological examination showed the symptoms of inflammation to be less marked than those in the mice of the Esch. coli group. Moreover, tumours had developed in a larger number of animals than they did in the Esch. coli group. There was no evidence, however, to show with certainty that streptomycin promoted the growth of tumours by suppressing the inflammation. This is attributable to the fact that the appearance of abscesses prevented a sufficient concentration of streptomycin at the site of infection. An experiment in which abscesses are not produced and only inflammatory lesions occur, so that the effect of antibiotics can be studied, should be carried out in the future.

Conclusions

The following facts are apparent from the first series of experiments. Implantation metastases can be readily induced on the peritoneum of mice by intraperitoneal inoculation of a suspension of loose cancer cells and small fragments of tumour. These metastases show a predilection for damaged tissue.

The number of peritoneal implantation metastases markedly decreases and the survival period increases when a substance to which the tumour cells are sensitive is administered shortly after inoculation.

The fact that a malignant tumour does not respond to a chemotherapeutic agent used in the treatment of cancer, whereas it does to another allied substance, serves to verify the finding that *every tumour has its own sensitivity pattern.* A clinical method enabling the rapid determination of this sensitivity has not been developed so far, though this is essential to the successful use of chemotherapeutic agents in the treatment of cancer. In addition, the study of more effective agents having an increased therapeutic range will have to be intensified. So long as these substances are not available, efforts should be made to pursue the development of the technique of isolated perfusion with anticarcinogenic chemicals of parts of the body in which a malignant tumour is localized and to render this method sufficiently reliable for clinical use.

These findings in animals should not be indiscriminately applied to clinical cases. However, it is the belief of the present author that the results obtained in these experiments strongly suggest, that the incidence of implantation metastasis and therefore that of unexpected recurrences will markedly decreases when a chemotherapeutic agent to which the tumour is sensitive is used during and shortly after surgical treatment, so that the growth of tumour cells left in the operative field will be prevented. In doing so, the other preventive measures previously referred to should not be neglected.

The second series of experiments showed that cancer cells introduced in a sterile medium are more likely to grow than those introduced in a medium infected with Esch. coli.

As it is in common use now to desinfect the intestine pre-operatively in operations for carcinoma of the intestine, the area in which the tumour cell is left will less likely be infected by bacteria than is was prior to the use of desinfection of the intestine. Subject to the necessary reservations, it can be concluded from these experiments that the risk of unexpected tumour recurrences has increased since desinfection of the intestine has become a routine procedure. Efforts to prevent tumour cells from being left in the operative field will have to be intensified, particularly in the case of anastomosis. If "aseptic" operations should be impossible, then anticarcinogenic chemotherapeutic agents should be used as an "antiseptic" measure.

LITTERATUURLIJST

1 Ackerman, L. V. and del Regato, J. A. Cancer; diagnosis, treatment and prognosis. St. Louis, The C.V. Mosby Company, 1954.
2 Ackerman, L. V. and Wheat, M. W. The implantation of cancer- an avoidable risk? Surgery 37 : 341; 1955.
3 Ariens, E. J. De chemotherapie bij kanker. Ned. Tschr. Geneesk. 101 : 1602; 1957.
4 Auerbach, Ch. and Moser, H. The effect of oxygen concentration on the mutagenic action of mustardgas. Experimentia 7 : 341; 1951.
5 Auerbach, Ch. Radiomimetic substances. Radiation Research 9 : 33; 1958.
6 Bader, G. M. and Papanicolaou, G. N. Application of cytology in diagnosis of cancer of rectum, sigmoid and descending colon. Cancer 5 : 307; 1952.
7 Bateman, J. C. Chemotherapy of solid tumors with tri-ethylene-thio-phosphoramide. N. Engl. J. Med. 252 : 879; 1955.
8 Bateman, J. C. e.a. Control of neoplastic effusion by phosphoramide chemotherapy. A.M.A. Arch. Int. Med. 95 : 713; 1955.
9 Bateman, J. C. and Carlton, H. N. Palliation of mammary carcinoma with phosphoramide drugs. J. Amer. Med. Ass. 162 : 701; 1956.
10 Bateman, J. C. and Winship, T. Palliation of ovarian carcinoma with phosphoramide drugs. Surg. Gyn. Obstetr. 102 : 347; 1956.
11 Beahrs, O. H. e.a. Implantation of tumor cells as a factor in recurrence of carcinoma of the rectosigmoid. Cancer 8 : 831; 1955.
12 Benson, W. e.a. Studies on the use of topical nitrogen mustard as an adjuvant to the surgical treatment of cancer. Proc. Amer. Ass. Cancer Res. 3 : 132; 1960.
13 Bernard, J. e.a. Chimioth'rapie des cancers et des leucémies. Presse Méd. 67 : 305; 1959.
14 Bierman, H. R. e.a. Therapy of inoperabel visceral and regional metastases by intra-arterial catheterization in man. Cancer Res. 11 : 236; 1951.
15 Blonk, D. J. Cytodiagnostiek by oesophagus- en maagaandoeningen. Tijdschr. voor G.E. 2 : 243; 1959.
16 Bollag, W. Tierexperimentelle Untersuchungen mit dem Cytostaticum 5 Fluoro-Uracil. Schweiz. Med. Wschr. 87 : 817; 1957.
17 Boreham, P. Implantation metastases from cancer of the large bowel. Brit. J. Surg. 46 : 103; 1958.
18 Bouwdijk Bastiaanse, M. A. van. Vooruitgang van de kankertherapie. VI: De verbetering van de chirurgische behandeling van de carcinomen op gynaecologisch gebied. Ned. Tschr. Geneesk. 103 : 217; 9159.
19 Bowden, L. and Papanicolaou, G. N. Exfoliated pancreatic cancer cells in the duct of Wirsung. Ann. Surg. 150 : 296; 1959.
20 Brock, N. und Wilmanns, H. Wirkung eines zyklischen N- Lost- Phosphamidesters auf experimentell erzeugte Tumoren der Ratte. Dtsch. Med. Wschr. 83 : 453; 1958.
21 Brown, C. E. and Warren, S. Visceral metastasis from rectal carcinoma. Surg. Gyn. Obstetr. 66 : 611; 1938.
22 Brown, C. H. and Kane, C. F. Carcinoma of the stomach; review of 406 cases seen from 1940 to 1945, operability, resectability and curability. Gastroenterology 22 : 64; 1952.
23 Bruinsma, A. H. Over het aandeel van de cyto-diagnostiek in het vroeg aantonen van carcinomen in slokdarm en maag. Acad. Proefschrift, Utrecht 1957.

24 Bryant, H. C. e.a. Cytologic study of gastric aspirate for carcinoma cells. J. Nat. Cancer Inst. 10 : 459; 1949.
25 Buinauskas, P. e.a. Role of operative stress on the resistance of the experimental animal to inoculated cancer cells. Ann. Surg. 148 : 642; 1958.
26 Butlin, H. T. The contagion of cancer in human beings: auto-inoculation. Lancet II : 279; 1907.
27 Churchill-Davidson, I. Oxygenation in radiotherapy; II Clinical application. Brit. J. Radiol. 30 : 406; 1957.
28 Cohn, I. and Atik, M. The influence of antibiotics on the spread of tumors of the colon. Ann. Surg. 151 : 917; 1960.
29 Cole, W. H. Recurrence in carcinoma of the colon and proximal rectum following resection for carcinoma. A.M.A. Arch. Surg. 65 : 264; 1952.
30 Cole, W. H. e.a. Carcinoma of the colon with special reference to prevention and recurrence. J. Amer. Med. Ass. 155 : 1549; 1954.
31 Cole, W. H. Precautions in the spread of cancer of colon and rectum. Ann. Surg. 140 : 135; 1954.
32 Cole, W. H. e.a. Dissemination of cancer cells. Bull. N.Y. Acad. Med. 34 : 163; 1958.
33 Cole, W. H. Plan for prophylactic treatment of cancer at the time of operation. Stencil dd. 8-1-1959.
34 Coller, F. A. e.a. Regional lymphatic metastases of carcinoma of the stomach. A.M.A. Arch. Surg. 43 : 748; 1941.
35 Coman, D. R. Decreased mutual adhesiveness; a property of cells from squamous cell carcinomas. Cancer Res. 4 : 625; 1944.
36 Coman, D. R. Cellular adhesiveness in relation to invasiveness of cancer; electron microscopy of liver perfused with chelating agent. Cancer Res. 14 : 519; 1954.
37 Conway, H. and Griffith, B. H. Carcinolytic effect of local T.S.P.A. on malignant melanoma. Amer. J. Surg. 95 : 994; 1958.
38 Cook, J. Kaposi's sarcoma treated with nitrogen mustard. Lancet I : 25; 1959.
39 Creech, O. e.a. Chemotherapy of cancer; regional perfusion utilizing an extracorporeal circuit. Ann. Surg. 148 : 616; 1958.
40 Creech, O. e.a. Treatment of melanoma by isolation-perfusion technique. J. Amer. Med. Ass. 169 : 339; 1959.
41 Creech, O. e.a. The treatment of cancer by perfusion. A.M.A. Arch. Surg. 79 : 963; 1959.
42 Creech, O. e.a. Experiences with isolation-perfusion technics in the treatment of cancer. Ann. Surg. 149 : 627; 1959.
43 Crile, G. Jr. Factors influencing the spread of cancer. Surg. Gyn. Obstetr. 103 : 342; 1956.
44 Cruz, E. P. e.a. Prophylactic treatment of cancer. Surgery 40 : 291; 1956.
45 Deelman, H. T. Metastasen. Ned. Tschr. Geneesk. 102 : 929; 1958.
46 Druckrey, H. Chemotherapie des Krebs; Experimentelle Grundlagen. Klin. Wschr. 33 : 784; 1955.
47 Druckrey, H. e.a. Endgültige Heilung grosser Yoshida-Sarkome durch N-oxyd-Lost. Dtsch. Med. Wschr. 83 : 489; 1958.
48 Dukes, C. E. The surgical pathology of rectal cancer. Proc. Royal Society Med. 37 : 131; 1944.
49 Engell, H. C. Cancer cells in the circulating blood. Acta Chir. Scand. Suppl. 201, 1955.
50 Engell, H. C. Cancer cells in the blood. Ann. Surg. 149 : 457; 1959.
51 Englebert Dunphey, J. e.a. Etiologic factors in polyposis and carcinoma of the colon (discussion). Ann. Surg. 150 : 488; 1959.

52 Esser, J. G. M. van. Over de cytologische herkenning van het coloncarcinoom. Acad. Proefschrift, Nijmegen 1959.
53 Evans, J. S. and Mengel, G. D. Antitumor activity of 5- bis (2- chloro-ethyl) amino-uracil against Sa. 180 and Ehrlich carcinoma (24439). Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 99 : 620; 1958.
54 Everson, T. C. and Cole, W. H. Spontaneous regression of cancer. Ann. Surg. 144 : 366; 1956.
55 Farber, S. e.a. Advances in chemotherapy of cancer in man. Advances in Cancer Research IV, 2 : 72; 1956.
56 Farber, S. Chemotherapy of cancer antimetabolites and antibiotics. Acta VIIe Intern. Cancer Congress XV : 35; 1959.
57 Farhat, S. M. e.a. Effect of mechlorethamine hydrochloride (nitrogen mustard) on healing of abdominal wounds. A.M.A. Arch. Surg. 76 : 749; 1958.
58 Farhat, S. M. e.a. Effect of thio TEPA upon healing of abdominal wounds. A.M.A. Arch. Surg. 78 : 729; 1959.
59 Fisher, E. R. and Turnbull, R. B. The cytologic demonstration and significance of tumorcells in the mesenteric venous blood in patients with colorectal carcinoma. Surg. Gyn. Obstetr. 100 : 102; 1955.
60 Fisher, B. and Fisher, E. R. Experimental studies of factors influencing hepatic metastases, III Effect of surgical trauma with special reference to liver injury. Ann. Surg. 150 : 731; 1959.
61 Fisher, E. R. and Fisher, B. Experimental studies of factors influencing hepatic metastases, I The effect of number of tumorcells injected, and time of growth. Cancer 12 : 926; 1959.
62 Fisher, B. and Fisher, E. R. Experimental studies of factors influencing hepatic metastases, II Effect of partial hepatectomy. Cancer 12 : 929; 1959.
63 Fleischner, F. G. and Berenberg, A. L. Recurrent carcinoma of the colon at the site of the anastomosis. Radiology 66 : 540; 1956.
64 Fremont-Smith, M. e.a. Cytologic method in the diagnosis of cancer. N. England J. Med. 238 : 179; 1948.
65 Galambos, J. T. and Klayman, M. I. Clinical value of colonic exfoliative cytology in diagnosis of cancer beyond the reach of the proctoscope. Surg. Gyn. Obstetr. 101 : 673; 1955.
66 Garret, M. e.a. A comparison of the balloon and lavage techniques in gastric cancer detection. Cancer 13 : 192; 1960.
67 Gatch, W. D. Degree of cohesion of cancer cells and its relation to cancer spread. A.M.A. Arch. Surg. 74 : 753; 1957.
68 Gephart, T. and Graham, R. M. The cellular detection of carcinoma of the esophagus. Surg. Gyn. Obstetr. 108 : 75; 1959.
69 Gerster, A. G. On the surgical dissemination of cancer. N.Y. Med. J. 41 : 233; 1885.
70 Gilchrist, R. K. and David, V. C. A consideration of pathological factors influencing 5 year survival in radical resection of the large bowel and rectum for carcinoma. Ann. Surg. 126 : 421; 1947.
71 Goei, R. K. S. Cytologisch onderzoek van pleura- en peritoneum punctaten op maligne tumorcellen (uitstrijkmethode). Ned. Tschr. Geneesk. 103 : 774; 1959.
72 Goligher, J. C. e.a. Local recurrences after sphincter saving excisions for carcinoma of the rectum and rectosigmoid. Brit. J. Surg. 39 : 199; 1951.
73 Grace, J. T. and Kondo, T. Investigations of host resistance in cancer patients. Ann. Surg. 148 : 633; 1958.

74 Gray, L. H. Oxygenation in radiotherapy; I Radiobiological considerations. Brit. J. Radiol. 30 : 403; 1957.
75 Grinnell, R. S. The spread of cancer of the colon and rectum. Cancer 3 : 641; 1950.
76 Grinnell, R. S. Results in the treatment of carcinoma of the colon and rectum. Surg. Gyn. Obstetr. 96 : 43; 1953.
77 Gross, R. and Lambers, K. Erste Erfahrungen in der Behandlung maligner Tumoren mit einem neuen N- Lost- Phosphamidester. Dtsch. Med. Wschr. 83 : 458; 1958.
78 Halley, M. M. e.a. The experimental and clinical use of a small capacity rapidly available pumpoxygenator. Surg. Forum IX : 196; 1959.
79 Harris, A. H. and Smith, R. R. Operative wound seeding with tumor cells; its role in recurrences of head and neck cancer. Ann. Surg. 151 : 330; 1960.
80 Hatiboglu, I. Prevention of the toxicity of nitrogen mustard (HN_2) by sodium thiosulfate. Proc. Amer. Ass. Cancer Res. 3 : 117; 1960.
81 Haut, A. e.a. The use of myleran in the treatment of chronic myelocytic leukemia. A.M.A. Arch. Int. Med. 96 : 451; 1955.
82 Haverback, C. Z. and Smith, R. R. Transplantation of tumor by suture thread and its prevention. Cancer 12 : 1029; 1959.
83 Hertz, R. e.a. Chemotherapy of chorio-carcinoma and related trophoblastic tumors in women. J. Amer. Med. Ass. 168 : 845; 1958.
84 Hickey, R. C. e.a. Cancer palliation. A.M.A. Arch. Surg. 79 : 416; 1959.
85 Hilberg, A. W. e.a. Woundseeding as a cause of failure in surgical therapy for cancer. Proc. 3rd Nat. Cancer Conf. 568; 1956.
86 Hinterberger, K. and Kretz, J. Clinical experiences with Bayer E 39. Krebsarzt 12 : 157; 1957.
87 Holzer, H. und Kröger, H. Zum carcinostatischen Wirkungsmechanismus von Äthylenimin-Verbindungen. Biochem. Zschr. 330 : 579; 1958.
88 Hörlin, W. und Schmitt, W. Über die Behandlung haematologischen Neoplasien mit N- Oxyd- Lost. Dtsch. Med. Wschr. 82 : 247; 1957.
89 Humphrey, E. W. and Hitchcock, C. R. Biological effects of the phosphoramides in patients with advanced cancer. Cancer 10 : 231; 1957.
90 Hunter, W. C. and Richardson, H. L. Cytological recognition of cancer in exfoliated material from various sources. Surg. Gyn. Obstetr. 85 : 275; 1947.
91 Jackson, F. C. e.a. Surgical implantation of Hodgkin's disease of the stomach to the skin of the abdominal wall. Ann. Surg. 150 : 1000; 1959.
92 Karnofsky, D. Nitrogen mustards in the treatment of neoplastic disease. Advances Int. Med. IV : 1—75; 1950.
93 Karrer, W. Zur Frage latenter Tumorzellherde. Wien. Klin. Wschr. 71 : 302; 1959.
94 Ketcham, A. S. The use of a hypochlorous acid derivate in the control of cancer. Cancer 13 : 20; 1960.
95 Klopp, C. T. e.a. Fractionated intra-arterial cancerchemotherapy with methyl-bis-amine-HCl. Ann. Surg. 132 : 811; 1950.
96 Klopp, C. T. Regional intra-arterial nitrogen-mustard as an adjunct to radiation therapy. Amer. J. Roentgenol. 70 : 1005; 1953.
97 Klopp, C. T. and Bateman, J. C. Some aspects of the clinical use of nitrogen mustards. Advances in Cancer Research II : 255; 1954.
98 Knape, M. Cytologische diagnostiek van maagcarcinoom. Acad. Proefschrift, Leiden 1956.
99 Knape, M. e.a. Cytologische diagnostiek van maagkanker d.m.v. spoeling met chymotrypsineoplossing. Ned. Tschr. Geneesk. 103 : 231; 1959.

100 Kramer, W. M. e.a. Inhibition of local tumor implantation with triethylene thiophosphoramide (TSPA). Cancer 11 : 999; 1958.
101 Kramer, W. M. e.a. Prevention of experimental lung metastases with thio TEPA. Surg. Gyn. Obstetr. 106 : 427; 1958.
102 Krementz, E. T. e.a. Treatment of malignant tumors of the extremities by perfusion with chemotherapeutic agents. J. Bone Surg. 41 A : 977; 1959.
103 Kuyjer, P. J. 105 Patiënten met carcinoma oesophagi. Ned. Tschr. Geneesk. 100 : 1799; 1956.
104 Kuyjer, P. J. Therapeutische en prognostische aspecten van maagkanker. Kankerjaarboek VII : 113; 1957.
105 Kuyjer, P. J. De vooruitgang van de kankertherapie; II maagkanker. Ned. Tschr. Geneesk. 103 : 79; 1959.
106 Kyle Bush, A. The surgical implantation of tumors. Am. Surg. 23 : 1012; 1957.
107 Lambert Lack, H. A contribution to the operative treatment of malignant disease of the larynx, with special reference to the danger of cancerous wound infection. Lancet I : 1638; 1896.
108 Larionov, L. F. e.a. Studies on the antitumour activity of p- di- (2 chloro ethyl) aminophenylalanine (Sarcolysine) Lancet II : 169; 1955.
109 Larionov, L. F. Some biologic and clinical results from investigations of chloro- ethylamines as antitumor drugs. Brit. J. Cancer 10 : 26; 1956.
110 Larionov, L. F. Experimental results with sarcolysin. Acta Unio Internat. Cancr. 13 : 393; 1957.
111 Larionov, L. F. The present status and futureprospects of cancerchemotherapy by alkylating agents. Acta VIIe Cancer Congress XV : 42; 1959.
112 Lawrie, H. Cancer contagion and inoculation. Brit. Med. J. I : 198; 1906.
113 Lennard Gold, G. e.a. A clinical study of 5- fluorouracil. Cancer Res. 19 : 935; 1959.
114 Lloyd Davies, M. S. e.a. Discussion on conservative resection in carcinoma of the rectum. Proc. Roy. Soc. Med. 43 : 697; 1950.
115 Lo, H. W. Heilung experimenteller Tumoren durch Operation unter "chemotherapeutischen Schutz". Zschr. Krebsforsch. 61 : 621; 1957.
116 Loeb, R. A. and Scapier, J. Rectal washings technic for cytologic study of rectosigmoid. Am. J. Surg. 81 : 298; 1951.
117 Lofgren, E. P. e.a. Local recurrence of carcinoma after anterior resection of the rectum and the sigmoid. A.M.A. Arch. Surg. 74 : 825; 1957.
118 Martin, D. S. and Fugmann, R. A. Clinical implications of the interrelationship of tumor size and chemotherapeutic response. Ann. Surg. 151 : 97; 1960.
119 Mayo, W. J. Grafting and traumatic dissemination of carcinoma in the course of operations for malignant disease. J. Amer. Med. Ass. 60 : 512; 1913.
120 Mc Allister, R. M. e.a. A quantitative technique for the measurement of in vitro cytotoxicity of 5 fluoro 2' desoxyuridine, nitrogen mustard and other antitumor agents. Cancer 12 : 938; 1959.
121 Mc Cutcheon, M. e.a. Studies on invasiveness of cancer: (adhesiveness of malignant cells in various human adenocarcinomas) Cancer 1 : 460; 1948.
122 Mc Donald, C. T. e.a. Limiting factors in the prophylaxis of the spread of cancer at operation by chemotherapeutic methods. Surg. Forum VIII : 164; 1957.
123 Mc Donald, G. O. e.a. The prophylactic treatment of malignant disease with nitrogen mustard and thioTEPA. Ann. Surg. 145 : 624; 1957.
124 Mc Donald, I. Biological predeterminism in human cancer. Surg. Gyn. Obstetr. 92 : 443; 1951.

125 Mc Grew, E. E., Laws, J. F. and Cole, W. H. Free malignant cells in relation to recurrence of carcinoma of the colon. J. Amer. Med. Ass. 154 : 1251; 1954.
126 Medical research cyanamid intern. Thio-TEPA: basic chemistry, pharmacology and toxicity. New York, Pearl River, 21. 10. 1958.
127 Meissner, A. Malignancy of gastric cancer. J. Nat. Cancer Inst. 10 : 533; 1949.
128 Moore, G. E. e.a. Tumor cells in the blood and body cavity associated with malignancy of the lung and gastrointestinal tract. Surg. Forum VIII : 152; 1957.
129 Moore, G. E. e.a. Clinical and experimental observations of the occurrence and fate of tumor cells in the blood stream. Ann. Surg. 146 : 580; 1957.
130 Moore, G. E. e.a. The chemotherapeutic effects and complications of actinomycin D in patients with advanced cancer. Cancer 11 : 1204; 1958.
131 Moore, G. E. and Kondo, T. Study of adjuvant cancer chemotherapy by model experiments. Surgery 44 : 199; 1958.
132 Moore, G. E. e.a. The comparative size and structure of tumor cells and clumps in the blood, bone marrow and tumor imprints. Cancer 13 : 111; 1960.
133 Morales, F. and Mc Donald, G. O. Toxicity of nitrogen-mustard in relation to operations. Surg. Forum VIII : 173; 1957.
134 Morales, F. e.a. The prophylactic treatment of cancer at the time of operation. Ann. Surg. 146 : 588; 1957.
135 Mrazek, R. G. e.a. Prophylactic and adjuvant use of HN_2 in the surgical treatment of cancer. Ann. Surg. 150 : 745; 1959.
136 Mrazek, R. G. and Economou, S. G. Palliative chemotherapy of solid tumors with nitromin. A.M.A. Arch. Surg. 78 : 51; 1959.
137 Mühlbock, O. Experimentele chemotherapie van tumoren. Kankerjaarboek VI : 165; 1956.
138 Murray Luck, J. The action of the phenylalanine mustards and of several homologs on mouse melanoma. Cancer Res. 17 : 1071; 1957.
139 Overstreet, R. J. and Mc Donald, G. O. The role of cellular dosage on "takes" following inoculation of Walker- 256- tumorcells in the rat. Surg. Forum VIII : 161; 1957.
140 Papanicolaou, G. N. Diagnostic value of exfoliated cells. J. Amer. Med. Ass. 131 : 372; 1946.
141 Paulson, D. L. Survival rates following resection for bronchogenic carcinoma. Ann. Surg. 146 : 997; 1957.
142 Pollard, H. M. e.a. Diagnosis of gastric neoplasms by cytologic examination of gastric secretions. J. Amer. Med. Ass. 139 : 71; 1949.
143 Pomeranz, A. A. and Garlock, J. H. Postoperative recurrence of cancer of colon due to desquamated malignant cells. J. Amer. Med. Ass. 158 : 1434; 1955.
144 Pool, E. H. and Dunlop, G. R. Cancer cells in the blood stream. Amer. J. Cancer 21 : 99; 1934.
145 Quer, E. A. e.a. Retrograde intramural spread of carcinoma of the rectum and sigmoid. Surg. Gyn. Obstetr. 96 : 24; 1953.
146 Quesne, L. P., le and Thomson, A. D. Implantation recurrence of carcinoma of rectum and colon. N. England J. Med. 258 : 578; 1958.
147 Raskin, H. F. e.a. Gastro intestinal cancer. A.M.A. Arch. Surg. 76 : 507; 1958.
148 Raskin, H. F. e.a. Role of exfoliative cytology in the diagnosis of cancer of the digestive tract. J. Amer. Med. Ass. 169 : 789; 1959.
149 Reemtsma, K. e.a. Treatment of selected adenocarcinomas by perfusion technique. A.M.A. Arch. Surg. 78 : 724; 1959.

150 Richardson, H. L. The cytohistological study of gastric washings. J. Nat. Cancer Inst. 10 : 467; 1949.
151 Ross, C. A. and Rodriguez, J. A. Regression of metastases after treatment of adenocarcinoma of stomach with TSPA. Cancer 13 : 118; 1960.
152 Roswit, B. Present status of chemotherapy of bronchial cancer. Radiology 69 : 499; 1957.
153 Ryall, C. Cancer infection and cancer recurrence: a danger to avoid in cancer operations. Lancet II : 1311; 1907.
154 Ryall, C. The technique of cancer operation with reference to the danger of cancer infection. Brit. Med. J. II : 1005; 1908.
155 Ryan, F. R. e.a. Effects of various perfusates in isolated vascular beds using an extracorporeal circuit. Surg. Forum IX : 193; 1958.
156 Rijssel, Th. G. van. Metastasering. Ned. Tschr. Geneesk. 103 : 1645; 1959.
157 Sandberg, A. A. and Moore, G. E. Examination of blood for tumor cells. J. Nat. Cancer Inst. 19 : 1; 1957.
158 Sandberg, A. A. e.a. The frequency of tumor cells in the bone marrow and blood. Cancer 11: 1180; 1958.
159 Sandberg, A. A. e.a. "Atypical" cells in the blood of cancer patients — differentiation from tumor cells. J. Nat. Cancer Inst. 22 : 555; 1959.
160 Saphir, O. The transfer of tumor cells by the surgical knife. Surg. Gyn. Obstetr. 63 : 775; 1936.
161 Schaberg, A. Het sociale gedrag van goedaardige en kwaadaardige cellen. Inaugurale rede 1958. R.U. Leiden. Stenfert Kroese.
162 Schatten, W. E. and Kramer, W. M. An experimental study of postoperative tumor metastases. Cancer 11 : 460; 1958.
163 Schneewind, J. H. and Fuller, J. B. The effect of HN_2 on adrenal cortex function. Cancer 11 : 1070; 1958.
164 Shapiro, D. M. and Fugmann, R. A. A role for chemotherapy as an adjunt to surgery. Cancer Res. 17 : 1098; 1957.
165 Shimkin, M. B. and Moore, G. E. Adjuvant use of chemotherapy in surgical treatment of cancer; plan of cooperative study. J. Amer. Med. Ass. 167 : 1710; 1958.
166 Shingleton, W. W. e.a. Studies on abdominal organ perfusion for cancer chemotherapy. Ann. Surg. 151 : 741; 1960.
167 Ship, A. G. e.a. Local chemotherapy of experimentally tumor-seeded wounds. Cancer 11 : 687; 1958.
168 Smith, R. R. e.a. Cancer cell contamination of operative wounds. Cancer 11 : 53; 1958.
169 Spriggs, A. I. Malignant cells in the bloodstream (Discussion on exfoliative cytology in the diagnosis of malignant disease). Proc. Royal Society Med. 53 : 169; 1960.
170 Stehlin, J. S. e.a. Malignant melanoma of the extremities; experiences with conventional therapy; a new surgical and chemotherapeutic approach with regional perfusion. Cancer 13 : 55; 1960.
171 Stehlin, J. S. e.a. Regional chemotherapy for cancer experiences with 116 perfusions. Ann. Surg. 151 : 605; 1960.
172 Stoll, B. A. Advanced cancer treated with nitromin. M. J. Austr. 2 : 882; 1956.
173 Stuart Roberts, S. e.a. Technique and results of isolation of cancer cells from the circulating blood. A.M.A. Arch. Surg. 76 : 334; 1958.
174 Stuart Roberts, S. e.a. Cancer cells in the circulating blood. Surg. Forum VIII : 146; 1958.

175 SUERMONDT, W. F. Carcinoom van het colon en van het rectum. Kankerjaarboek V : 53; 1955.
176 SULLIVAN, R. D. e.a. Antimetabolite- metabolite combination cancer chemotherapy. Effects of intra- art. methotrexate- intramusc. citrovorum-factor therapy in human cancer. Cancer 12 : 1248; 1959.
177 SUNDERLAND, D. A. The significance of vein invasion by carcinoma of the rectum and sigmoid. Cancer 2 : 429; 1949.
178 SUTOW, W. W. Chemotherapy in childhood cancer. Texas Med. J. 54 : 299; 1958.
179 THOMAS, C. G. and BROWN, B. C. Studies on the prevention of surgical implantation of cancer. Ann. Surg. 151 : 581; 1960.
180 TULLIS, J. L. Triethylenephosphoramide in treatment of disseminated melanoma. J. Amer. Med. Ass. 166 : 37; 1958.
181 VINK, M. De betekenis van implantatiemetastasering en darmdesinfectie voor het locaal recidief. Acad. Proefschrift, Utrecht 1952.
182 VINK, M. Local recurrence of cancer in the large bowel; the role of implantation metastases and bowel desinfection. Brit. J. Surg. 41 : 431; 1954.
183 VINK, M. De invloed van chirurgische manipulatie aan darmgezwellen op het ontstaan van recidief. Ned. Tschr. Geneesk. 101 : 1611; 1957.
184 VOS, J. J. Th. Lymphangitis carcinomatosa. Ned. Tschr. Geneesk. 86 : 743; 1942.
185 WALTHER, H. E. Krebsmetastasen. Basel, 1948.
186 WARREN, S. and GATES, O. The fate of intravenously injected tumor cells. Amer. J. Cancer 27 : 485; 1936.
187 WASSINK, W. F. Vooruitgang in behandeling van kwaadaardige gezwellen. I algemene inleiding. Ned. Tschr. Geneesk. 103 : 17; 1959.
188 WATERMAN, N. Inleiding tot en grepen uit de chemotherapie van het carcinoom. Kankerjaarboek II : 60; 1952.
189 WEISBERGER, A. S. Use of nitrogen mustard in treatment of serous effusions of neoplastic origin. J. Amer. Med. Ass. 159 : 1704; 1955.
190 WHITE, L. P. The lethal role of the spleen in the toxicity of nitrogen mustard. Proc. Amer. Ass. Cancer Res. 3 : 73; 1959.
191 WHITE, W. C. The problem of local recurrence after radical mastectomy for carcinoma. Surgery 19 : 149; 1946.
192 WIEBERDINK, J. Over metastasering van kanker. Acad. Proefschrift, Groningen 1950.
193 WISSEMAN, C. L. Jr. e.a. Cytologic diagnosis of cancer of descending colon and rectum. Surg. Gyn. Obstetr. 89 : 24; 1949.
194 WOODHALL, B. e.a. Chemotherapy of brain cancer. Ann. Surg. 150 : 640; 1959.
195 WRIGHT, J. C. Chemotherapy of human cancer. Transact. N.Y. Acad. Sciences Series II 17 : 210; 1954—'55.
196 WRIGHT, J. C. e.a. Clinical evaluation of puromycin in human neoplastic disease. A.M.A. Arch. Int. Med. 96 : 61; 1955.
197 WRIGHT, J. C. The effect of tri-ethylene-thiophosphoramide on fifty patients with incurable neoplastic diseases. Cancer 10 : 239; 1957.
198 WRIGHT, J. C. e.a. Chemotherapy of disseminated carcinoma of the breast. Ann. Surg. 150 : 221; 1959.
199 ZEIDMAN, I. and BUSS, J. M. Experimental studies on the spread of cancer in the lymphatic system. I: Effectiveness of the lymphnode as a barrier to the passage of embolic tumor cells. Cancer Res. 14 : 403; 1954.
200 ZEIDMAN, I. Experimental studies on the spread of cancer in the lymphatic system. IV: Retrograde spread. Cancer Res. 19 : 1114; 1959.